

Биологические науки

*Т.И. Громоных, *С.В. Луценко, **Фан Ми Хань, *Н.Б. Фельдман, * Т.Н. Данильчук

ПЕРСПЕКТИВЫ НАПРАВЛЕННОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ В МЕДИЦИНЕ

*

*

*

*

*

**

—

, Biotechnology Center of Ho Chi Minh city (HСMВiotech).

Ключевые слова:

Gluconacetobacter,

Keywords: bacterial cellulose, producing *Gluconacetobacter*, polymer, nanomaterials

Резюме

Gluconacetobacter hansenii,

Gluconacetobacter hansenii GH-1/2008 (-10547).

81

-50,

« 14236-».

97,0±1 %,

Gluconacetobacter hansenii GH-1/2008,

Summary

The objective was to study the properties of bacterial cellulose, synthesized producer *Gluconacetobacter hansenii* and assessing potential use in medicine. Producing strain cultured in static and dynamic mode. When the steady state culture synthesizes the film producer, with dynamic - globules of different sizes. Nanostructure films examined with a scanning probe microscope "Solver NEXT". Durability, flexibility of bacterial cellulose films were investigated in accordance with GOST 14236-81 tensile machine RM-50, the properties of the cellulose absorbing and expelling drug components was carried out by

incubation in solutions of antibiotics and nanosilver. The polymer was obtained in the form of globules and the film has a moisture 97,0 ± 1%, has good adsorptive properties of drugs and nanosilver.

Bacterial cellulose has a network of densely packed microfibrils which are immobilized producing cell. Producing cells are removed, and the nanostructure of the bacterial cellulose is not changed. Bacterial cellulose polymer synthesized by a strain of *Gluconacetobacter hansenii* GH-1/2008, can be applied in medicine as dressings and highly effective to create a transdermal therapeutic systems due to the high elasticity, high

strength and absorption of drugs.

Природный полимер бактериальная целлюлоза является уникальным наноматериалом, который в настоящее время уже находит широкое применение в медицине, пищевой и фармацевтической промышленности. В настоящее время уже получено много продуктов на основе

бактериальной целлюлозы. На основе данного биополимера получают традиционный продукт "Nata-de Coco", а также пищевые волокна, применяемые как ингредиент продуктов функционального и лечебно-профилактического питания.

Бактериальная целлюлоза находит свое применение в регенеративной медицине для вживления в раневые

Учеными из Бразилии было доказано, что биопленка, образующая гидрогель во влажном состоянии (92,2% воды), вызывает иммунного ответа со стороны организма и не показывает клинических признаков токсичности, что доказывает её биосовместимость [8, 9].

Показано, что бактериальную целлюлозу можно «сшивать» с различными пептидами или другими высокомолекулярными молекулами для создания определенного терапевтического эффекта. Связанную с остеогенным пептидом роста (OGP) бактериальную целлюлозу вживляли мышам, что вызывало у них увеличение экспрессии некоторых костных биомаркеров, таких как Al#P

для пром получения

и в полуконтактном режиме с использованием кантилевера NSG01/10. Обработку изображений с помощью прибора проводили с использованием информационных технологий по программе Image Analysis 3.0, которая содержит широкий выбор разнообразных методов анализа и соответствующих им двумерных и одномерных функций.

Прочность

исследовали в соответствии с ГОСТ 14236-81 на разрывной машине РМ-50 при одноосном режиме по показателям максимальная нагрузка разрыва (кг), напряжение разрыва (МПА), удлинение (%). Испытания проводили при температуре $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ и относительной влажности $(55 \pm 5)\%$, при скорости деформирования образца 100 мм/мин. Для измерения толщины образца использовали толщиномер по ГОСТ 17035-86 [1].

Известно, что одним из важнейших направлений использования бактериальной целлюлозы является создание покровных материалов для заживления раневых инфекций. Определение свойств пленок бактериальной целлюлозы впитывать и отдавать лекарственные компоненты проводили путем выдерживания в растворах антибиотиков стрептомицина

(10 ppm), ампициллина (10 ppm), а также наносеребра (10, 20 и 30 ppm) фирмы РЛС® в течение 30 минут. Антимикробные свойства соединений, адсорбированных на полученных пленках бактериальной целлюлозы проводили дискодиффузионным методом с использованием тест-штаммов *Staphylococcus aureus* 6538-Р, *Escherichia coli* М-17 [1]. В качестве контроля использовали фильтрованную бумагу (ТУ 2642-002-80625010-01) с нанесенными антибиотиками и нано серебром в тех же концентрациях. Из полученных пленок и фильтровальной бумаги вырезали диски диаметром 8 мм, которые затем использовали для оценки активности лекарственных препаратов и наносеребра.

Результаты исследований

При жидкофазном культивировании продуцента в динамическом режиме получали пеллеты, размеры которых зависели от скорости перемешивания. Так, при культивировании продуцента с перемешиванием 50-100 об/мин полимер образуется в виде волокон или бесформенной биомассы, при более высоких оборотах перемешивания – 200-250 – образуются пеллеты, размер диаметра которых составляет от 15 до 20 мм (рисунок 1).

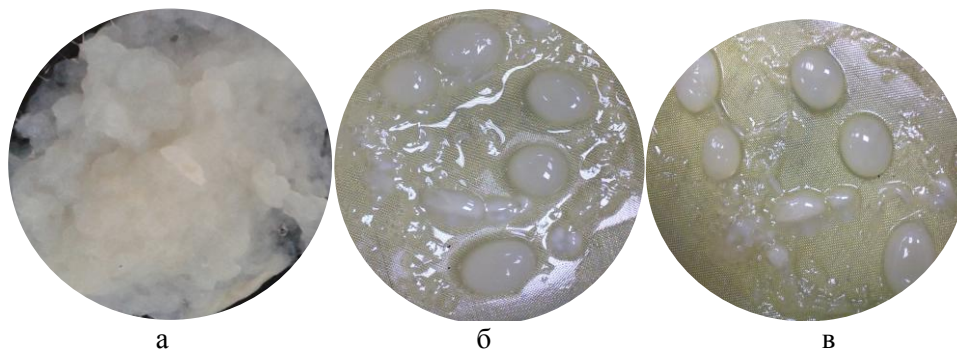


Рисунок 1 – Морфология полимера бактериальной целлюлозы, синтезируемой продуцентом *Gluconacetobacter hansenii* GH-1/2008 при культивировании с перемешиванием: а – 100, б – 200, в – 250 об/мин

Такой формы полимер бактериальная целлюлоза хорошо высушивается и измельчается в виде порошка. Этот порошок может быть рекомендован для использования в качестве пищевой добавки или носителя препаратов для получения

лекарственных форм.

При стационарном культивировании продуцент синтезирует пленки бактериальной целлюлозы, толщина которых зависит от времени культивирования (рисунок 2).

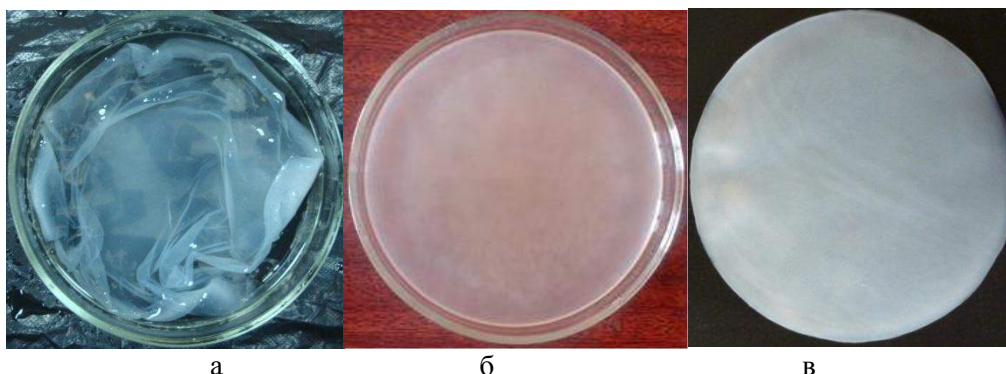


Рисунок 2 – Пленки бактериальной целлюлозы, синтезируемые продуцентом *Gluconacetobacter hansenii* GH-1/2008 при статическом культивировании: а – толщина 9,78 мкм, б – толщина 15,75 мкм, в – толщина 30,65 мкм

Обе формы полимера показали одинаковое содержание влаги: $97,0 \pm 1$ %. При различных способах высушивания (лиофильная, конвекционная сушка) полимер быстро насыщается влагой до исходной величины, не изменяя своих свойств.

Изучение микроструктуры пленок, синтезируемых штаммом, методом атомно-силовой микроскопии показало, что они содержат плотно упакованные микрофибриллы, на которых иммобилизованы клетки продуцента

(рисунок 3, а). Волокна бактериальной целлюлозы, синтезируемые бактериями *G.hansenii* GH-1/2008, имеют нитевидную форму. Эти нитевидные волокна объединяются в мицеллы и формируют микрофибриллы с диаметром 15 - 20нм. Микрофибриллы объединяются в макрофибриллы с диаметром 50 – 100 нм. После двукратной обработки пленок раствором 0.5N NaOH и затем водой клетки продуцента удаляются, однако наноструктура бактериальной целлюлозы не изменяется (рисунок 3, б).

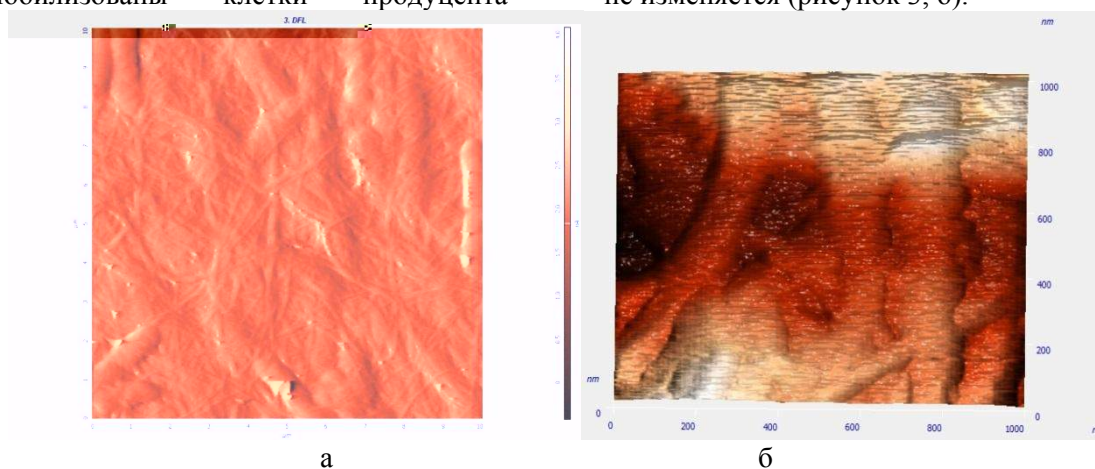


Рисунок 3 – Наноструктура пленок бактериальной целлюлозы, синтезируемой штаммом *Gluconacetobacter hansenii* GH-1/2008: а – до отмывания клеток, б – после отмывания клеток

Исследования показали, что образцы полимера, в зависимости от толщины пленки, различались прочностью, нагрузкой и относительным удлинением при растяжении образца (таблица 1). Пленки, имеющие толщину 9,78 и 10, 63 мкм оказались более прочными, чем пленки,

имеющие большую толщину. Чтобы разорвать такую пленку требуется больше нагрузки. И наоборот, требуется меньше нагрузки для разрыва пленки бактериальной целлюлозы, которая имеет толщину больше.

Таблица 1 - Результаты испытаний прочности и эластичности пленок бактериальной целлюлозы

Толщина образца (мкм)	Макс. Нагрузка (N)	Макс. прочность (МПа)	Относительное удлинение (%)
9,78	10,42	106,6	3,01
10,63	9,13	90,29	3,15
13,13	8,2	73,29	3,49
15,75	7,6	73,00	2,50
30,65	6,4	65,34	1,75

Аналогичная обратно пропорциональная зависимость относительного удлинения при растяжении пленки бактериальной целлюлозы от ее толщины. Как показали исследования, чем меньше толщина пленки, тем больше её эластичность и прочность.

Исследования показали, что бактериальная целлюлоза имеет хорошую абсорбционную способность. Она может абсорбировать концентрацию антибиотиков до 30 ppm. Зоны угнетения роста тест-культур при использовании дисков бактериальной целлюлозы недостоверно различались в сравнении с дисками из

фильтровальной бумаги (таблица 2). Кроме того, в исследованиях установлено, что адсорбционные свойства наносеребра значительно выше у бактериальной целлюлозы, чем у фильтровальной бумаги. При оценке антимикробной активности наносеребра, адсорбированного на фильтровальную бумагу, не было выявлено зон отсутствия роста тест-объектов. Таким образом, в этом аспекте бактериальная целлюлоза имеет значительное преимущество в сравнении с растительной целлюлозой.

Таблица 2 – Определение антибиотической активности адсорбированных антибиотиков и нано серебра на пленках бактериальной целлюлозы

Вариант	Концентрация, ppm	Диаметр зоны угнетения роста (мм) тест-штамма	
		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
Амипициллин, бактериальная целлюлоза	20	30.5	-
Контроль, фильтровальная бумага	20	31,8	-
Амипициллин, бактериальная целлюлоза	30	40.0	-
Контроль, фильтровальная бумага	30	40,5	-
Стрептомицин бактериальная целлюлоза	20	41.5 ± 0.2	32,6 ± 0.2
Контроль, фильтровальная бумага	20	39,4	33.0
Стрептомицин бактериальная целлюлоза	30	45.0	37.0
Контроль, фильтровальная бумага	30	42,5	36,8
Нано Ag	20	12.0	14.3
Контроль, фильтровальная бумага	20	-	-

Примечание: «-» - отсутствие зоны угнетения роста тест-организма

Таким образом, полимер бактериальной целлюлозы, синтезируемый штаммом *Gluconacetobacter hansenii* GH-1/2008, может применяться в медицине в качестве

высокоэффективных перевязочных материалов и для создания трансдермальных терапевтических систем, благодаря высокой эластичности,

прочности и высокой адсорбции лекарственных препаратов. Полученные результаты показывают, что эта бактериальная целлюлоза также может быть хорошим материалом для других использований в медицине и открывать новые горизонты её применения, поскольку она состоит из элементов с наноразмерными размерами.

Литература

- ГОСТ 14236-81 Пленки полимерные. Метод испытания на растяжение. Введ. 01.07.81. - М.: Госстандарт России: Изд-во стандартов, 1989. – 11 с.
- Егоров Н.С. Основы учения об антибиотиках. – М.: Наука, 2004. - 528 с.
- Патент на изобретение № 2464307. Штамм бактерии *Gluconacetobacter hansenii* GN-1/2008 – продуцент бактериальной целлюлозы // Авторы Громовых Т.И., Фан Ми Хань, Данильчук Т.Н. Заявка № 2011121841. Оpubл. 20.10.2012.
- Патент РФ № 2523606 Штамм *Gluconacetobacter sucrofermentans* - продуцент бактериальной целлюлозы // Авторы Ревин В. В., Лияськина Е.В. Заявка 2013-03-12. Опубликовано: 20.07.2014.
- Фан Ми Хань, Громовых Т.И. Получение бактериальной целлюлозы микробиологическим синтезом // Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук. – № 5 – 2012. С. 67 – 68.
- Хрипунов А.К., Баклагина Ю.Г., Синяев В.А. и др. Исследование нанокompозитов на основе гидратированных фосфатов кальция и целлюлозы *Acetobacter xylinum* // Физ. хим. стекла. 2008. Т. 34. С. 248-258.
- Chawla P.R. et al. Fermentative Production of Microbial Cellulose / P.R. Chawla et al. // Food Technol. Biotechnol, 2009, 47 (2).- p.107–124.
- Fragoso AS, Silva MB, de Melo CP, Aguiar JLA, Rodrigues CG, de Medeiros PL, Branco Júnior JF, Andrade CA, Oliveira MD. Dielectric study of the adhesion of mesenchymal stem cells from human umbilical cord. on a sugarcane biopolymer. J Mater Sci Mater Med. 2014;25(1):229-37.
- Pita PC, Pinto FC, Lira MM, Melo Fde A, Ferreira LM, Aguiar JL. Biocompatibility of the bacterial cellulose hydrogel in subcutaneous tissue of rabbits. Acta Cir. Bras. vol.30 no.4 São Paulo Apr. 2015 Epub Apr 2015.
- Pigossi SC, Oliveira GJ, Finoti LS and al. Bacterial cellulose-hydroxyapatite composites with osteogenic growth peptide (OGP) or pentapeptide OGP on bone regeneration in critical-size calvarial defect model. J Biomed Mater Res A. 2015 Apr 7. doi: 10.1002/jbm.a.35472.
- Park S, Park J, Jo I, Cho SP, Sung D and al. In situ hybridization of carbon nanotubes with bacterial cellulose for three-dimensional hybrid bioscaffolds Biomaterials. 2015 May 1; 58:93-102. doi: 10.1016/j.biomaterials. 2015.04.027.

ИНВАЗИРОВАННОСТЬ НЕМАТОДОЗАМИ ЛОШАДЕЙ ТАБУННОГО СОДЕРЖАНИЯ В ЦЕНТРАЛЬНОЙ ЯКУТИИ

Степанова С.М., Кокколова Л.М, Л.Ю. Гаврильева

В Республике Саха (Якутия) табунное коневодство распространено практически повсеместно и имеет как продуктивное, так и рабочее направление. Инвазированность лошадей табунного содержания гельминтами в республике достаточно высокая, она определяет уровень заболеваемости животных. В настоящее

время гельминты встречаются в основном в виде полиинвазии, вызывая у молодняка не только отставание в росте, но даже гибель отдельных особей, а у взрослых животных снижением работоспособности, особенно у кобыл проявляется снижением молочной продуктивности, иногда и абортom. Широкое распространение инвазии и

высокая степень экстенсивности и интенсивности инвазии, оказывает серьезный экономический ущерб для дальнейшего развития коневодства (С.И. Исаков, Л.М. Кокколова, В.П. Григорьев, 2000; С.И. Исаков, Л.М. Кокколова, 2006; Л.М. Кокколова, Л.Ю. Гаврильева, 2013).

Задачей наших исследований явилось изучение инвазированности нематодозами лошадей табунного содержания в Центральной Якутии

Материалы и методы

Зараженность лошадей изучали овоскопическим методом исследования по Фюллеборну. Для определения вида обнаружение личинок нематод исследовали методом Бермана. Исследования лошадей табунного содержания на нематодозы проводили в коневодческих хозяйствах Центральной Якутии. Всего было обследовано 80 голов жеребят и 98 голов взрослого поголовья лошадей табунного содержания из них 90 гол. кобыл и 8 гол. жеребцов.

Результаты исследований

Результаты исследования показали повсеместную распространенность нематодозов. Пораженность поголовья лошадей нематодами различных видов составляло 100%. При изучении видов нематод, у 80 голов жеребят оксиурами были поражены 56 голов, экстенсивность инвазии (ЭИ) составляло 70%, из 98 голов взрослого поголовья оксиурами были заражены 64 голов (ЭИ=65,3 %). Поголовья исследованных нами молодняка 80 голов и взрослого 98 были поражены стронгилятами (ЭИ=100%). Параскарисы были обнаружены у 74 жеребят (ЭИ=92,5%) и у 76 голов взрослого поголовья лошадей (ЭИ= 77,6%).

При культивировании личинок нематод были определены виды стронгилят – *Delafondia vulgaris*, *Alfortia edentatus*, *Strongylus equines* и многочисленные виды семейства *Trichonematidae*. Зараженность лошадей гельминтами протекало в форме микстинвазий.

При изучении сезонной динамики нематодозов и определения сроков инвазирования лошадей табунного содержания яйцами гельминтов показало, что яйца деляфондий у жеребят в фекалиях впервые нами были зарегистрированы в конце октября, а пик инвазии наблюдали в

декабре, январе и в феврале; яйца альфортий впервые выявляли в фекалиях жеребят в декабре, а пик инвазии достигала в феврале; яйца стронгилюсов е обнаруживали в конце февраля, а пик инвазии – в апреле. Яйца оксиур выявляли с середины августа, а пик инвазии приходило на осенне-зимние месяцы. Чаще всего болезнь протекала у молодых лошадей в возрасте 3-х лет. Заболевание стронгилятозом, параскаридозом наблюдали, как среди взрослых лошадей, так и молодняка. Заражение параскаридами жеребят в первом году жизни начинается с мая, а пик инвазии наблюдали в осенне-зимний период. В течение зимы инвазированность жеребят понижалась.

Заключение

По результатам проведенных исследований нами, было, установлено, что нематодозы лошадей табунного содержания имеют широкое распространение и в Центральной Якутии. Зараженность стронгилятами у взрослых лошадей и жеребят составляет 100%, а экстенсивность параскаридозной инвазии у жеребят достигает 92,5%, у основного стада – 77,6%, оксиуры чаще выявляли у молодняка да 2 лет, ЭИ составляет 70%, а основного поголовья до 65,3 %.

Infestation nematosis horses herd content in Central Yakutia. Stepanova S.M., Kokolova L.M., Gavrilyeva L.Y.

Summary. The results showed ubiquity nematosis . Prevalence herd of horses of various types of nematodes was 100 % . In the study of species of nematodes , 80 colts oksiurami goals were struck 56 goals , extent of infestation (EI) was 70 % , from 98 adult animals were infected livestock oksiurami 64 goals (ee = 65.3 %) . Livestock we studied 80 young and adult animals were struck strongilyatami 98 (ee = 100%) . Paraskarisy were found in 74 foals (ee = 92.5 %) and 76 goals the adult population of horses (ee = 77.6 %) .

Литература

1. Кокколова Л.М. Применение антгельминтных препаратов против гельминтозов и оводовых инвазий у табунных лошадей в Якутии / С.И. Исаков, Л.М. Кокколова, В.П. Григорьев // Сб. научн. тр. «Достижение науки в производстве». - Якутск, 2000. - С. 122-125.
2. Исаков С.И. Профилактика

гельминтозов лошадей табунного содержания Якутия С.И. Исаков, Л.М. Кокколова // Сб. докл. 1 Международный конгресс по табунному коневодству «Устойчивое развитие табунного коневодства» - Якутск, 2006. - С. 128-134.

гельминтозов лошадей табунного содержания Якутия Л.М. Кокколова, Л.Ю. Гаврильева // XVI межд. конф. «Аграрная наука с/х производство Сибири, Монголии, Казахстана и Болгарии». - Якутск, 2013. - 158 с.

3. Кокколова Л.М. Изучение основных

АССОЦИАТИВНАЯ ИНВАЗИЯ ДОМАШНИХ ОЛЕНЕЙ В ЯКУТИИ

Кокколова Л.М., Григорьев И.И., Румянцева Т.Д.

Из трематод наиболее распространенными являются паразитирующие в рубце оленя инвазионные котилофороны – Cotylophoron skrjabini, Paramphistomum cervi и Dicrocoelium orientalis. Из рубца животного находили котилофорон до 2150, и парамфистов 1080 парамфистов и дикроцелий в 4 половозрелых особей.

Ц

В оленеводческих хозяйствах ими могут быть инвазированы до 75% взрослого поголовья оленей. У домашних оленей паразитирует 9 видов цестод из них 4 вида Moniezia мониезий – Moniezia ragdferini оленей

Ц

жизни в явике инвазио л п ая жа Л даЛ У тел М М с жог 4 возраст хол ундаовой коШе я 20 до °. ост Ше зиж ел лшч нки Ц стгонг л схп появж тся М Ра ае, нвааф дредшне мая сра Ме аа жхнш й животныт. р МмЮссхжн пара , стгонг л схп х

МНО "Inter-Medical" #VII(13), 2015 Биологические науки
Инвазия оленей в Якутии. Кокколова Л.М., Григорьев И.И., Румянцева Т.Д.

Инвазия

с и М протекает, как гельминтозное заболевание оленей.

являются оленей и их клинические симптомы. Для диагностики используют фекально-каловые методы.

Мониезий – паразитирует у домашних оленей. Мониезия рагдферни оленей.

клинические признаки были отмечены, начиная с марта в момент значительного скопления половозрелых гельминтов в легких. У оленей паразитируют личиночные стадии цестод относящиеся к семейству Taeniidae. Из личиночных форм цестод у оленей были обнаружены личиночная стадия гельминта *Echinococcus granulosus*. Наиболее неблагополучными по эхинококкозу является Момский район, где эхинококковые цисты обнаружили у 4,3%, в Алданском – 0,94%, Нижнеколымском – 0,47% оленей из числа вскрытых нами животных. В органах и тканях оленей паразитируют 3 разновидности цистицеркоза. Цистицеркозы – паренхиматозный, тарандный или мышечный, тениукольный или финноз брыжейки. Экстенсивность заражения отдельными видами цистицеркоза колеблется в пределах: паренхиматозным от 7,3 до 84,6% тарандным от 0,1 до 25,5% и тениукольным - от 0,2 до 5,6%. В тундровой зоне, особенно неблагополучны оленеводческие хозяйства в Нижнеколымском районе, где зараженность оленей паренхиматозным цистицеркозом достигало 92,5%, а в хозяйствах Анабарского – 17,7%, Аллаиховского – 10,6%, Оленекского – 10,5%. В горно-таежной зоне: Оймяконском районе – 24,6%, Момском – 14,3%, Томпонском – 11,8%, в южной Якутии: Алданском – 2,56%, Нерюнгринском – 1,26%. Зараженность оленей мышечным цистицеркозом в тундровой зоне: Нижнеколымском – 2,6%, Анабарском – 2,56%, Аллаиховском – 1,42%, Оленекском – 1,54%, в горно-таежной: Оймяконском – 25,5%, Томпонском – 1,3%. В Южных районах: Алданском – 0,1%, Нерюнгринском – 1,2%. Зараженность тениукольным цистицеркозом незначительна. Зараженные цистицерками олени зарегистрированы в Нижнеколымском районе у 3 (0,12%), Аллаиховском у 5 (0,28%), Оймяконском у 3 (0,12%) голов из числа исследованных нами животных. Основным источником заражения оленей цистицеркозом являются зараженные

половозрелыми цестодами оленегонные собаки. Экстенсивность и интенсивность инвазии у собак значительно выше, чем у других видов плотоядных животных. Для предотвращения заражения собак и других плотоядных личиночными стадиями тении выбраковывают и сжигают все органы, зараженные цистицерками. Организуют систематический отлов и уничтожение безнадзорных собак.

На территории Якутии существуют природные очаги эхинококкоза. При исследовании на пораженность органов и тканей оленей цистным эхинококкозом – *Echinococcus granulosus* (larva) были инвазированы 17,2% диких северных оленей в тундровой и 0,2% в таежной зоне домашних оленей [1].

Перед нами стояла задача выявить основных вариаций паразитов при микстинвазиях, изыскание эффективных и экологически безопасных средств лечения и профилактики паразитарных болезней северных оленей горно-таежной зоны.

По результатам исследований уточнен состав возбудителей паразитарных болезней северных оленей в горно-таежной и тундровой зон Якутии. Выявлены основные вариации паразитов при микстинвазиях. Изучена возрастная и сезонная динамика распространения паразитарных болезней домашних северных оленей в горно-таежной и тундровой зонах Якутии. Таким образом, получены новые данные по ассоциации инвазий и составу возбудителей паразитарных болезней северных оленей.

1. Кокколова Л.М. Эпизоотология (эпидемиология) и меры борьбы с гельминтозами в Якутии /Кокколова Л.М. Автореф. докт. дисс., – Москва, 2007. 48С.

2. Сыроватский Д.И. Перспективы якутского оленеводства. //Сыроватский Д.И. //Сб. мат. научн.-практ.конф, посв. 50-летию Якутского НИИСХ СО РАСХН (Якутск, 25 июля 2006 г.). – Новосибирск, 2007. – 250-254 с.

ДОМАШНИЕ ПИТОМЦЫ, ПРОФИЛАКТИКА ИНФЕКЦИОННЫХ И ИНВАЗИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Коколова Л.М., Гаврильева Л.Ю., Касьянова С.С.

Kokolova L.M., Grigoriev I.I. Rummyantseva T. D.

Associative invasion reindeer in Yakutia

Summary. New data on the composition of the association invasions of pathogens and parasitic diseases reindeer. The basic variations of the parasites in the mixed - invasions. Studied the age and seasonal dynamics of the spread of parasitic diseases.

All owners of dogs, cats, and possibly other small pets aware that annual vaccination and deworming - is a necessary measure to ensure that their pet is protected from the most dangerous and common infectious and parasitic diseases. But even now, in the 21st century, there are many conflicting opinions on this subject. Modern vaccines and anthelmintic drugs improved and lack of previous shortcomings.

Keywords: pets, cat, dog, vaccine, drugs, treatment, prevention, vaccination age.

Введение

Но даже сейчас, в 21 веке, существует множество противоречивых мнений на эту тему. Перечислим некоторые из заблуждений, хозяева считают, что «Моя собака (кошка) никуда не ходит, значит и не заболит; зачем ей прививки» но ведь на улицу-то вы ходите! Поэтому занос инфекции животному возможен с вами, например, с вашей обувью и одеждой. К тому же у вашего питомца, если он постоянно находится в закрытом помещении, будет ослаблен иммунитет. Летом они, находясь на даче, могут контактировать и с другими домашними животными, грызунами. Несмотря на наличие большого количества антгельминтиков проблема гельминтозов животных остается актуальной и по сегодняшний день. Гельминты домашних плотоядных представляют особый интерес для изучения, так как многие из них являются возбудителями болезней человека и сельскохозяйственных животных. Так, из 82 видов гельминтов, зарегистрированных у собак и кошек гельминтов на территории России 32 два вида могут паразитировать у человека и 26 видов у сельскохозяйственных животных.

Методы и материалы исследований

Исследование домашних питомцев кошек и собак.

Методика исследования больных животных включает клинический осмотр, проводит в нефиксированном и фиксированном состоянии, проводить измерения температуры тела, термометры должны быть проверенными и хранить их нужно в дезрастворе. Наблюдение за

животным, как реагирует на раздражения, прием корм и воды, каковы консистенция и вид фекалий, как происходят дефекация и мочеиспускание. Метод диагностики включаем и гематологические исследования. Гельминтологические исследование с применением методов Фюллеборна, Бермана и применить другие общепринятые методы.

Результаты исследований

Некоторые владельцы своих питомцев прививают, начиная с 2-х месячного возраста, затем ждут смены зубов и часто забывают о повторной прививке. А ведь титр антител после первой вакцинации, не «закрепленный» второй инъекцией, понижается и становится неэффективен для защиты от инфекций. А у декоративных пород собак очень часто встречается задержка смены зубов до 8-10-месячного возраста. И все это время собака не защищена от опасных инфекций, современные вакцины и антгельминтные препараты усовершенствованы и лишены прежних недостатков. Поэтому прислушайтесь к мнению специалистов. Вакцина от бешенства – вводится животному, начиная с 3-х месячного возраста. Декоративные собаки переносят эту процедуру так же, как и другие породы собак. Маленьким породам собак (по размеру) необходимо вводить половинную дозу вакцины. Но в зависимости от индивидуальных особенностей (условия содержания, кормление, порода, кратность вакцинации) может вырабатываться недостаточный титр антител для защиты от вируса (менее 3,5 МЕ /мл и даже менее 0,5 МЕ/мл). Соблюдение сроков и кратности

вакцинации предотвращает снижение титра антител. Другой вопрос в том, что у животного может быть какая-либо врожденная или приобретенная патология и тогда возможность вакцинации обсуждается индивидуально. Необходимо вакцинироваться ежегодно. Напряжённый иммунитет сохраняется после вакцинации только в течение года, дальше он начинает ослабевать. У переболевших большинством вирусных, инфекционных болезней животных, иммунитет на дальнейшее заражение не вырабатывается.

С возрастом иммунитет слабеет, и животные, впрочем, как и человек, наоборот, становятся восприимчивее к болезням. Действительно, есть некоторые вирусные болезни, которые чаще поражают щенков и котят, но и взрослые могут ими заразиться. Что касается вакцинации кошек, то они ничуть не реже собак страдают от вирусных болезней и также нуждаются в защите.

Лечить от гельминтов необходимо своих и беспородных питомцев, так как и они также подвержены болезням. Современные вакцины и антгельминтные препараты, как правило, прекрасно переносятся организмом животных и не вызывают побочных явлений. Случаи индивидуальной непереносимости и осложнений очень редки, если соблюдены правила вакцинации, о которых речь пойдёт ниже. Возможно, решающим аргументом в пользу вакцинации и дегельминтизации,

будет информация о существовании так называемых «зооантропонозов» - болезней, которыми человек заражается от животных. От большинства из них можно застраховаться хозяину и окружающим представляющие опасность заражения для человека от собак и кошек токсокароз, дипилидиоз и опаснейшие зооантропонозы – эхинококкоз и альвеококкоз. Антигельминтные препараты действуют на гельминты по разному, они могут вызвать контрактуру мускулатуры гельминтов, губительно действовать на мышечную, нервную систему паразитов, могут способствовать нарушению деятельности пищеварительной системы гельминтов.

Для дегельминтизации собак и кошек применяем антигельминтные препараты: Азинокс (для собак и кошек) обладает широким спектром антигельминтного действия на все стадии развития ленточных гельминтов 1 табл/10 кг. веса животного. Азинокс плюс (для собак) обладает широким спектром антигельминтного действия на все стадии развития круглых и ленточных гельминтов 1 табл/10 кг. веса животного. Дронтал плюс (для собак), Дронтал (для кошек), Дирофен (для котят и щенков) для лечения и профилактики болезней вызванных нематодами и цестодами 1 табл/на 1 кг.

В случае значительного угнетения, длительного отказа от еды – необходимо обратиться к специалистам.

ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСОВ ПЛАТИНЫ (II),(IV) НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ В КЛЕТКАХ ЛИНИИ MCF-7

*Мумятова В.А. * Балакина А.А. ** Терентьев А.А. ****

*
**

— ()

MCF-7 ()

6

Изучено действие комплексов платины(II),(IV) и аминитроксильного комплекса платины(IV) на экспрессию генов антиоксидантной системы: супероксиддисмутазы 1 (sod1), супероксиддисмутазы 2

(sod2), каталазы (cat) и глутатионпероксидазы 1 (gpx1). Обнаружено, что все комплексы платины(IV) индуцировали увеличение экспрессии гена gpx1, sod2 наблюдалось только при действии аминнитроксильного комплекса платины.

(II),(IV),

Resume

The aim of present work is to study antioxidant system (AOS) activity in response to the action of cytotoxic platinum complexes with different structure. The experiments were carried out on the MCF-7 (human breast adenocarcinoma) cell culture.

Cells were treated with different concentrations of investigated chemical compounds for 6 hours. Gene expression was investigated by real-time PCR.

The effect of the platinum (II),(IV) and platinum(IV)-nitroxyl complexes on the antioxidant system genes expression (superoxide dismutase 1 (SOD1), superoxide dismutase 2 (SOD2), catalase (CAT) and glutathione peroxidase 1 (GPX1)) was studied. It was found that all of the platinum complexes(IV) induced GPX1 gene upregulation of, while increased SOD2 expression was induced only by platinum(IV)-nitroxyl complex action.

Keywords: complexes (II),(IV) of platinum, antioxidant system, gene expression.

Введение

Злокачественные новообразования являются одной из основных причин смертности во всем мире. Главным недостатком современных противоопухолевых препаратов является их высокая токсичность [14]. В настоящее время побочные эффекты и высокую токсичность противоопухолевых препаратов платиновой группы связывают с нарушениями про- и антиоксидантного баланса и накоплением активных форм кислорода [5,15].

Нитроксильные радикалы являются антиоксидантами и проявляют разнообразную биологическую активность [13], например, могут реагировать с активными радикалами не только стехиометрически, но и выступать в качестве катализаторов редокс-реакций и миметиков ферментативных систем. В миллимолярных концентрациях нитроксильные радикалы обладают цитотоксическим действием [8], а также способны улучшать химиотерапевтические свойства различных классов противоопухолевых соединений [6].

Таким образом, актуальным является изучение роли нитроксильных радикалов в составе платина(IV)-нитроксильных комплексов в механизмах противоопухолевого действия.

В связи с важной ролью активных форм кислорода и окислительного стресса в побочных эффектах платиновых комплексов целью работы было исследование влияния платиновых комплексов разной структуры, в том числе содержащих нитроксильные радикалы, на функционирование антиоксидантной

системы.

Материалы и методы

Соединения. В работе исследовались цитотоксические соединения платины (II) и аминнитроксильные комплексы платины (IV) полученные по ранее описанной методике [1,2]. Исследованные комплексы платины (II): цисплатин - *cis*-диамин-дихлороплатина(II) и комплексы платины(IV): сатраплатин или JM216 - *e*-аммин-*d*-(циклогексил)-*a,f*-бис(ацетат)-*b,c*-дихлороплатина(IV), а также аминнитроксильный комплекс платины(IV) – BC-131 (*e*-аммин-*d*-(4-амино-2,2,6,6-тетраметилпиперидин-1-оксил)-*a,f*-бис(пентаноат)-*b,c*-дихлороплатина(IV)). Комплекс BC-131 содержит в своей структуре нитроксильный радикал, что предполагает его специфичное воздействие на антиоксидантную систему клеток.

Клеточная культура. Эксперименты проводили на клеточной культуре MCF-7 - аденокарцинома молочной железы человека. Клетки культивировали при температуре 37 °C в атмосфере 5% CO₂, в среде ЕМЕМ, содержащей 10% эмбриональную телячью сыворотку («Biowest», Франция).

Синтез первичной цепи cDNA. Синтез проводили с помощью MMLV RT kit («Евроген») согласно методике производителя.

ПЦР в реальном времени. ПЦР проводили с помощью qPCRmix-HS SYBR («Евроген») согласно методике производителя. Программа амплификации стандартная:

1. предварительный прогрев: T 95°-5 мин;

2. денатурация: T 95° - 10 сек;
3. отжиг: T 60° - 30 сек;
4. элонгация: T 70° - 20 сек.

Количество циклов: 45.

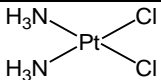
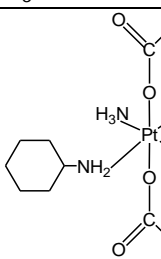
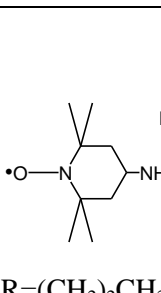
Результаты и обсуждения

Для изучения экспрессии генов ключевых ферментов АОС в опухолевых

Таблица 1

клетках исследуемые комплексы добавляли в двух различных концентрациях – доза IC50 (таблица 1) и двукратная доза IC50. Результаты экспериментов представлены на рисунках 1-4.

Значения IC50 комплексов платины для клеток линии MCF-7 24 ч

Соединение	IC50, мкМ	Структура
ЦП	54,2	
JM216	58,15	
BC-131	13,45	 R=(CH ₂) ₂ CH ₃

Изучение экспрессии гена *sod1* показало, что значительное увеличение показателя наблюдали только при действии комплексов платины(IV) – сатраплатина и BC-131. Следует отметить, что аминонитроксильный комплекс индуцировал увеличение экспрессии в 5 раз, в то время как JM216 – только в 2 раза. Увеличение концентрации не вызвало существенных изменений в случае цисплатина и сатраплатина, однако значительно снизило экспрессию гена при использовании комплекса BC-131 (рис.1).

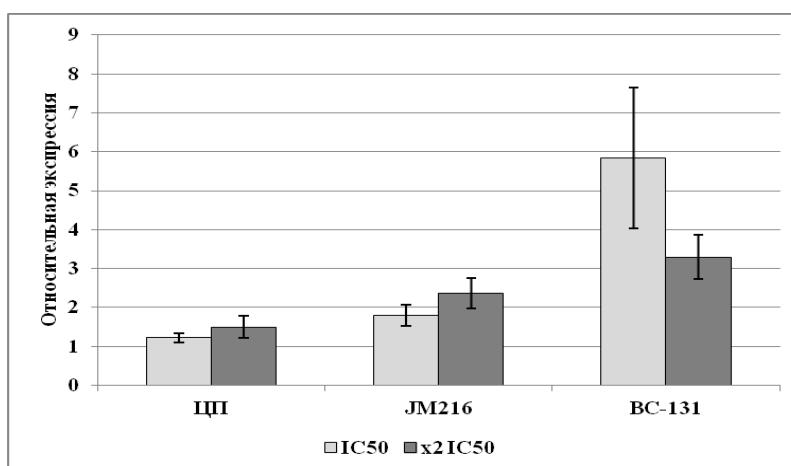


Рисунок 1. Относительная экспрессия гена *sod1* в клетках линии MCF-7 при действии разных концентраций комплексов платины.

Ген *sod2* является маркером окислительного стресса, увеличение

экспрессии которого свидетельствует о накоплении перекиси водорода, что в свою очередь индуцирует увеличение экспрессии гена *cat* для ее удаления из клетки. Однако, значительное увеличение экспрессии генов

sod2 (в 2,5 раза) и *cat* (в 2 раза) наблюдали лишь в случае аминитроксильного комплекса ВС-131. При этом изменение его концентрации не оказало существенного влияния (рис.2,3).

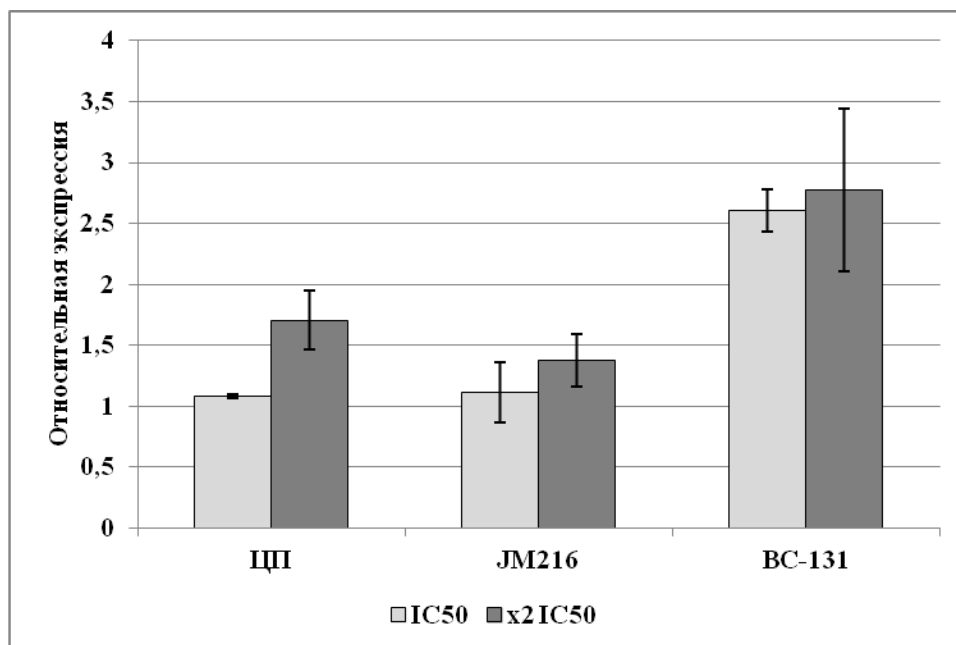


Рисунок 2. Относительная экспрессия гена *sod2* в клетках линии MCF-7 при действии разных концентраций комплексов платины.

Следует подчеркнуть, что исследуемые комплексы платины минимально влияют на изменение экспрессии гена *cat*. (рис.3). Возможно, это связано с тем, что при действии комплексов платины происходит

накопление перекиси водорода в опухолевых клетках, необходимой для запуска механизмов программируемой клеточной гибели.

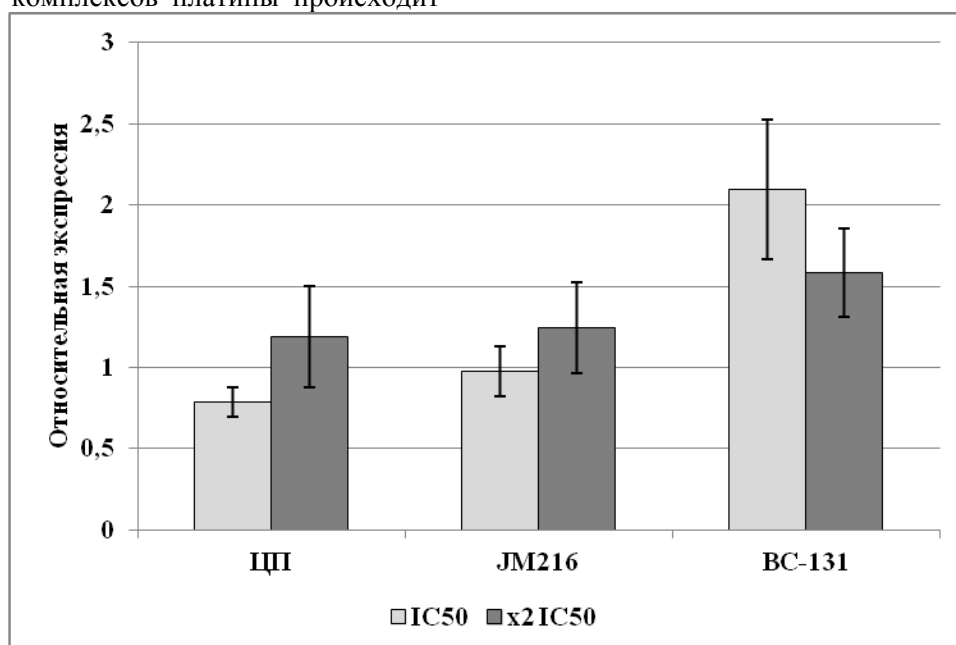


Рисунок 3. Относительная экспрессия гена *cat* в клетках линии MCF-7 при действии разных концентраций комплексов платины.

Из всех изученных генов АОС только в случае *gpx1* наблюдали значительное увеличение

экспрессии под действием всех комплексов платины, при этом увеличение концентрации комплексов в 2 раза вызывало существенное накопление продуктов гена (рис.4).

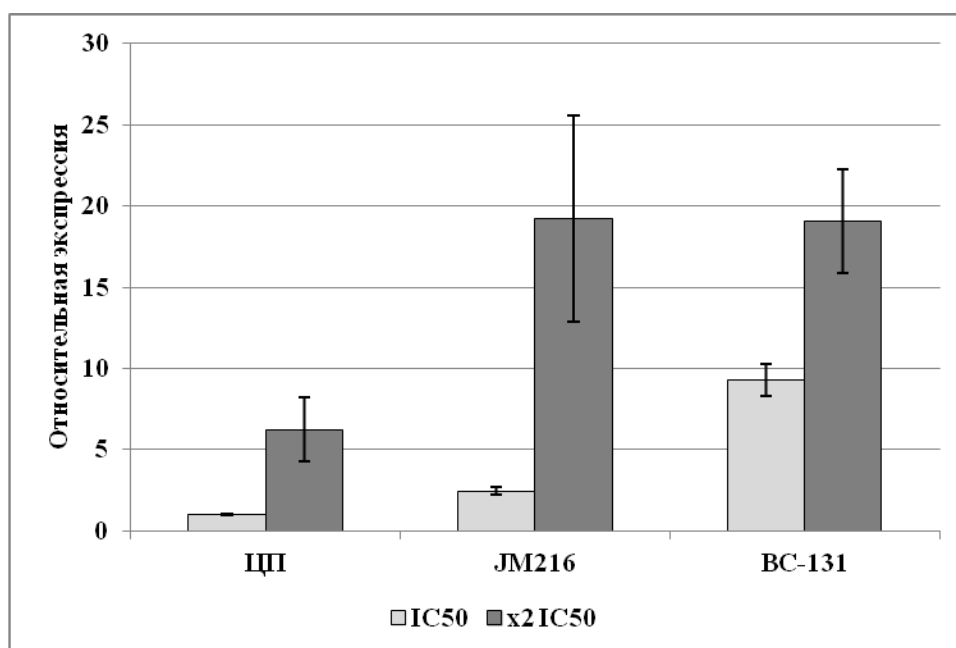


Рисунок 4. Относительная экспрессия гена *gpx1* в клетках линии MCF-7 при действии разных концентраций комплексов платины.

Это связано с тем, что глутатион и ферменты глутатионового обмена играют важную роль в поддержании редокс-статуса клеток и механизмах внутриклеточной детоксикации комплексов платины с образованием неактивных конъюгатов платины и глутатиона [10]. Из литературы известно, что уровень глутатиона и экспрессия ферментов глутатионового обмена в клетках опухолей с лекарственной устойчивостью выше, по сравнению с нормальными тканями [3,7]. Кроме этого существует ряд работ по изучению связи между чувствительностью клеток к препаратам платины и содержанием глутатиона или активностью ферментов глутатионового обмена [9,11,12,4].

Список использованной литературы

Комлева Н. В., Костюк Г. В., Пархоменко И. И., Балалаева И. В., Голубев В. А., Сень В. Д., Терентьев А. А. Сравнительный анализ цитотоксичности и влияния на клеточный цикл аммонитроксильных комплексов платины (IV).

2011. № 2. 82.

1. Сень В.Д., Терентьев А.А., Коновалова Н.П. Синтез, взаимодействие с ДНК и противоопухолевая активность комплексов платины с аминитроксильными радикалами.

Известия Академии наук. Серия химическая. 2011. № 7. С. 1319-1328.

2. Balendiran GK, Dabur R., Fraser D. The role of glutathione in cancer. Cell Biochem. Funct. 2004. V. 22. P. 343-352.

3. Britten RA, Green JA, Broughton C, Browning PGW, White R, Wahrenius H. The relationship between nuclear glutathione levels and resistance to melphalan in human ovarian tumour cells. Biochem Pharmacol. 1990. V. 41. P. 647-649.

4. Conklin K. A. Chemotherapy-Associated Oxidative Stress: Impact on Chemotherapeutic Effectiveness. Integr Cancer Ther. 2004. Vol. 3. P. 294-300.

5. Emanuel N.M., Konovalova N.P. Nitroxyl radicals for cancer chemotherapy // In: Bioactive Spin Labels / ed. R.I. Zhdanov. B. – N.Y.: Springer-Verlag, 1992. P. 439-460.

6. Estrela JM, Ortega A, Obrador E. Glutathione in cancer biology and therapy. Crit Rev. Clin. Lab. Sci. 2006. V. 43. P. 143-181.

7. Gariboldi M.B., Lucchi S., Caserini C., Supino R., Oliva C., Monti E. Antiproliferative effect of the piperidine nitroxide TEMPOL on neoplastic and nonneoplastic mammalian cell lines. Free Radical Biology and Medicine. 1998. V. 24. № 6. P. 913-923.

8. Godwin A, Meister A, O'Dwyer P, Huang C, Hamilton T, Anderson M. High resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines is associated with marked increase in glutathione synthesis. Proc Natl Acad Sci. 1992. USA. V. 89. P. 3070–3074.

9.

основном, биопленки можно охарактеризовать как бактерии, внедренные в толстый слизистый слой, состоящий из сахаров и протеинов. Этот клеточный барьер защищает микроорганизмы от внешних воздействий [Ильина с соавт., 2004]. Образование биопленок является одним из важнейших факторов вирулентности патогенных бактерий. Микроорганизмы, растущие в биопленках, обладают высокой устойчивостью к антимикробным препаратам, а также к иммунным механизмам. Биопленки связаны с различными заболеваниями человека, такими как эндокардит клапана, кистозный фиброз, периодонтит, средний отит, инфекции желчных путей и др., колонизируют медицинское оборудование, а также имплантаты, провоцируя рецидивирующие инфекции [Hancock et al., 2007].

Экзополисахаридная структура биопленок является общей для всех видов бактерий, способных к их образованию [Donlan et al., 2002]. Это предполагает общие генетические механизмы регуляции формирования биопленок. В связи с чем, особый интерес представляет идентификация отдельных генов, участвующих в глобальном процессе формирования биопленок. В качестве модельного микроорганизма нами был выбран непатогенный грамположительный *Bacillus subtilis*.

Целью работы явилось сравнительное исследование дикого и мутантного (протеазодефицитного) штаммов *Bacillus subtilis* на способность к образованию биопленок на жидкой среде.

Материалы и Методы.

Объекты исследования явились дикий (природный) штамм *Bacillus subtilis* 168 и

мутантный штамм *Bacillus subtilis* BRB14 с deletированными генами девяти внеклеточных протеиназ (*trpC2*, *nprB*, *aprB*, *erp*, *bpr*, *nprE*, *mpr*, *vpr*, *wprA*) и двух мембраносвязанных протеиназ (*htrA* и *hrt*).

Культивирование штаммов проводили на среде LB, LB с добавлением глюкозы в конечной концентрации 1%, а также на синтетической среде, описанной в [Morikawa M. et al., 2006]. Культивирование проводилось при pH 7,4 и температуре 37 °C.

Определение способности к образованию биопленок проводили по методике, описанной в [Merritt J. et al., 2005].

Результаты и обсуждение

Было исследовано влияние различных сред культивирования на интенсивность образования биопленок штаммами *Bacillus subtilis* (рис.1). В качестве богатых питательных сред были использованы среда LB, а также LB с добавлением глюкозы в конечной концентрации 1%. Внесение в среду культивирования дополнительного легкодоступного источника углеводов (глюкозы) могло оказаться стимулирующим фактором для образования биопленок. В результате эксперимента было выявлено снижение уровня образования биопленок в среде с добавлением глюкозы на 20% относительно LB без глюкозы (рис. 1). Использование для культивирования составной синтетической среды позволило повысить уровень образования биопленок обоими штаммами приблизительно в 7 раз относительно обеих сред LB.

Уровень образования биопленок диким штаммом превышал таковой у мутантного штамма на 50% на средах LB и 10% на синтетической среде (рис.1).

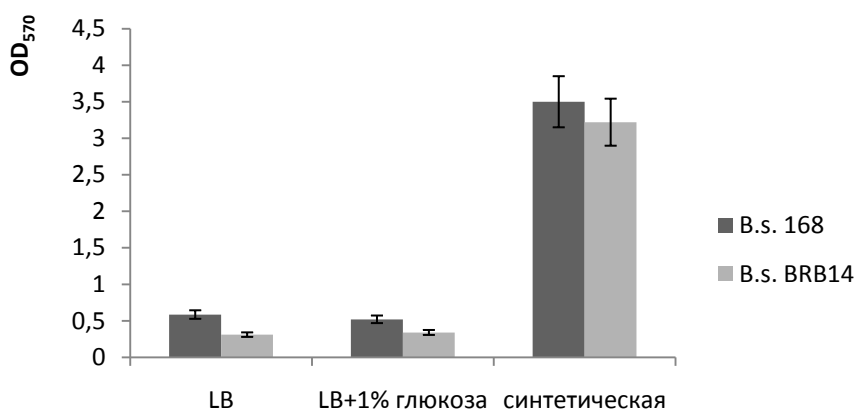


Рис.1. Образование биопленок диким (B.s. 168) и протеазодефицитным (B.s. BRB14) штаммами *B. subtilis* на различных средах в течение 48 ч при 37 °С. Представлены усредненные данные 4 независимых экспериментов. $\sigma \leq 10\%$.

Очевидно, высокое содержание энергетически богатых питательных веществ в среде культивирования не способствует образованию биопленок. Возможно, переход культуры к жизненной стратегии формирования биопленок обусловлен дефицитом питательных веществ. При этом, не все делетированные

в мутантном штамме *B. subtilis* BRB14 внеклеточные протеиназы, по-видимому, принимают участие в процессе образования биопленок, так как разница между штаммами невелика.

Также была исследована динамика образования биопленок штаммами *B. subtilis* на синтетической среде (рис.2).

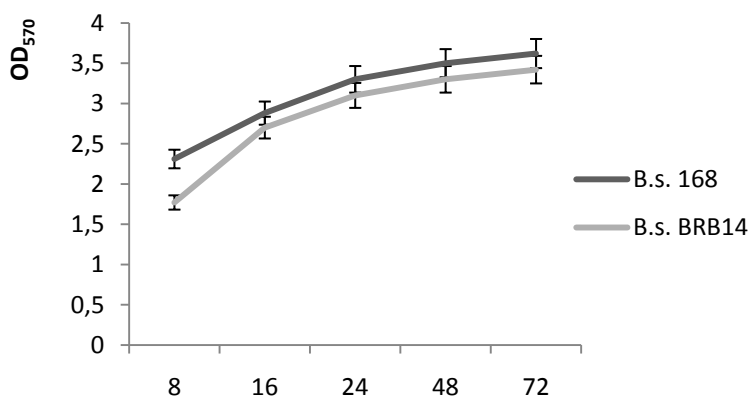


Рис. 2. Динамика образования биопленок диким (B.s. 168) и протеазодефицитным (B.s. BRB14) штаммами *B. subtilis* на синтетической средах при 37 °С. Представлены усредненные данные 4 независимых экспериментов. $\sigma \leq 10\%$.

В результате эксперимента было показано, что максимальная интенсивность образования биопленок штаммами *B. subtilis* наблюдается до 24 часа роста культуры. Затем начинается замедление и к 72 часу культивирования график образования штаммами биопленок выходит на плато. При этом разница в образовании биопленок между штаммами также как и в предыдущем эксперименте не превышает 10%.

Выводы

В результате проведенных экспериментов было установлено, что оба штамма *B. subtilis* лучше (на 700%) образуют биопленки на синтетической среде, чем на богатых питательных средах. Штаммы имеют сходные кривые динамики образования биопленок. В одинаковых условиях уровень образования биопленок диким штаммом на 10% превышает уровень протеазодефицитного штамма. Это может указывать на то, что внеклеточные и мембраносвязанные протеиназы,

делетированные в мутантном штамме *B. subtilis* BRB14 лишь частично участвуют в процессе формирования биопленок культурой продуцента, либо участвует в процессе лишь некоторые из них, причем не играют в данном случае ключевой роли.

Список литературы

1. Ильина Т.С., Романова Ю.М., Гинцбург А.Л. Биопленки как способ существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина: феномен, генетический контроль и системы регуляции их развития. Генетика. 2004; 40(11):1–12.
2. Donlan R.M., Costerton J.W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. Clin Microbiol. 2002; 15(2):167–193.
3. Hall-Stoodley L., Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections. Cell Microbiol. 2009; 11(7):1034–1043.
4. Hancock V., Klemm P. Global Gene Expression Profiling of Asymptomatic Bacteriuria *Escherichia coli* during Biofilm Growth in Human Urine. Infect Immun. 2007; 75(2):966–976.
5. Merritt J.H., Kadouri D.E., O'Toole G.A. Growing and analyzing static biofilms. Curr.Protoc.Microbiol. 2005; Chap.1: Unit1B.1.
6. Morikawa M., Kagihiro S., Haruki M., Takano K., Branda S., Kolter R., Kanaya S. Biofilm formation by a *Bacillus subtilis* strain that produces γ -polyglutamate. Microbiology. 2006; 152:2801-2807.

ical features. Defined the spectrum

B. Subtilis

B. Subtilis

B. Subtilis

*conditionally pathogenic and pathogenic microflora
in cows are in the article.*

*in acute inflammation. Genera and species belonging isolated microorganisms were determined according to the determinant Burgi given related to Gram staining and morpholog
bacteriostatic and bactericidal action of B. Subtilis with respect to the agents investigated postnatal pathology
and its antibiotic resistance. To determine these parameters was used the agar diffusion method. The resul
showed high efficiency of B. Subtilis in the treatment of endometritis and mastitis as an ecological competitor to
conditionally pathogenic and pathogenic microflora.*

биоресурсов и природопользования Крымского федерального университета им. В.И. Вернадского и финансировалась из средств государственной бюджетной темы гнойно-катаральным эндометритом и острым катаральным маститом, в возрасте от 4 до 6 лет украинской молочной и голштинской пород с различным уровнем продуктивности ($n=14$), содержащихся в условиях учебно-научно-производственного животноводческого центра АБиП КФУ им. В. И. Вернадского.

Диагностику послеродовой патологии репродуктивных органов проводили согласно «Методическим указаниям по диагностике, лечению и профилактике акушерско-гинекологических болезней и ветеринарному контролю за воспроизводительной функцией коров».

Мастит диагностировали на основании клинических, лабораторных (реакции с 5% - ным раствором димастина) и бактериологических исследований. Забор исследуемого материала (молока) проводился у коров одного возраста и периода лактации.

Для бактериологического исследования у коров отбирали секрет слизистой оболочки матки на 4-5 сутки после отела, секрет молочной железы получали на 2-й день болезни.

Отобранные с соблюдением правил асептики смывы из влагалища и шейки матки коров получали по методике Рубцова. Полученные пробы высевали на искусственные питательные среды: МПА, МПА с 7,5 % натрия хлорида, среда Эндо, среда Сабуро и цветные среды Гисса и др. Учет выросших колоний проводили после 48-часовой инкубации в термостате при 37 °С.

Из отобранных для исследований проб молока делали посевы на жидкие и плотные питательные среды: МПБ, МПА, Эндо, Сабуро, среды Гисса. Учет выросших колоний проводили после 48-часовой инкубации в термостате при 37 °С.

Изучение морфологических и культурально-биохимических свойств штаммов микроорганизмов, изолированных из объектов исследования, проводили по унифицированным методикам. Родовую и видовую принадлежность выделяемых микроорганизмов определяли с учетом их биологических свойств, согласно

НИР (госзаказ Министерства образования и науки РФ 2015/701-7).

Исследования проводили на животных, больных одновременно острым определителем Берджи.

Для определения антагонистических свойств штамма *B. subtilis* по отношению к возбудителям мастита и эндометрита, стандартизированную по оптическому стандарту мутности (1 млрд. м.т./мл) культуру исследуемого штамма вносили в стерильную чашку Петри в количестве 1 мл и заливали расплавленным МПА (46 – 48°С). После застывания агара с помощью металлической трубки диаметром 0,5 мм вырезали лунки (по 5 в каждой чашке Петри). В лунки вносили по 2 капли суточной культуры *B. subtilis*, чашки ставили в термостат при температуре (37±1) °С на 24-48 ч. После инкубации учитывали бактерицидное (полное отсутствие роста) и бактериостатическое действие *B. subtilis* по отношению к возбудителям мастита и эндометрита. Для контроля исследуемые микроорганизмы высевали на МПА в отдельные чашки Петри, где отсутствовала суточная культура *B. subtilis*.

Чувствительность штамма к антибиотикам определяли с помощью стандартных дисков, пропитанных антибиотиками. В чашку Петри с МПА наливали 1 мл клеточной суспензии препарата в 0,9 %-ном растворе натрия хлорида и равномерно распределяли по поверхности агара АГВ. Избыток удаляли пастеровской пипеткой. На поверхности засеянного агара пинцетом раскладывали диски с антибиотиками по 5 дисков на каждую чашку. Чашки выдерживали в термостате при температуре 37±1°С в течение 18±2 ч, после чего измеряли зоны задержки роста вокруг дисков, включая диаметр самого диска.

Результаты.

При бактериологическом исследовании цервикальной слизи нами установлено, что течение острых гнойно-катаральных эндометритов у коров осложняется обсеменением матки патогенной и условно-патогенной микрофлоры, которая представлена различными ассоциациями грамположительных кокков (*Staphylococcus aureus* (выделяли в 42,9% случаев), *Staphylococcus epidermidis* (28,5%), *Enterococcus faecialis* (14,3%), и

грамотрицательных бактерий (*Escherichia coli* (71,5%), *Pseudomonas aeruginosa* (14,3%) и *Proteus vulgaris* (71,5%))

При бактериологическом исследовании проб молока от больных маститом животных микроорганизмы выделяли в 100% случаев. Проведённые исследования показали, что при субклинической форме

Таблица 1

Спектр антагонистической активности штамма *B. subtilis* в отношении патогенных штаммов, вызывающих острый гнойно-катаральный эндометрит у коров

Тест – микробы	Зона торможения роста, мм
<i>Proteus vulgaris</i>	8 – 10
<i>Staphylococcus aureus</i>	8 – 12
<i>Escherichia coli</i>	10 – 12
<i>Streptococcus</i>	12 – 14

Таблица 2

Спектр антагонистической активности штамма *B. subtilis* в отношении патогенных штаммов, вызывающих субклинический мастит у коров

Тест – микробы	Зона торможения роста, мм
<i>Proteus vulgaris</i>	9 – 10
<i>Staphylococcus aureus</i>	20 – 24
<i>Escherichia coli</i>	11 – 14
<i>Streptococcus</i>	12 – 15

Из данных таблиц следует, что штамм *B. subtilis* обладает широким спектром антагонистической активности к

патогенным бактериям, вызывающих эндометрит и мастит у коров,

Таблица 3

Антибиотикорезистентность штамма *B. subtilis*.

N	Наименование антибиотика	Зоны задержки роста, мм	
		Содержание бактерий в 1 мл культуры штамма	
		1x10 ⁶	1x10 ⁹
1	Ампициллин	0-6	0-6
2	Бензилпенициллин	6-8	6-8
3	Неомицин	10-14	10-14
4	Полимиксин	0	0
5	Стрептомицин	0-8	0-8
6	Рифампицин	10-16	10-16
7	Гентамицин	0-6	0-6
8	Канамицин	10-15	10-15
9	Левомецитин	18-20	18-20
10	Тетрациклин	6-8	6-8
11	Доксициелин	4-6	4-6
12	Энрофлоксацин	8-9	8-9

Из полученных данных следует, что препарат устойчив к действию антибиотиков пенициллинового ряда (β-лактамным антибиотикам: пенициллину, карбенициллину, ампициллину), полимиксину, а также малочувствителен к

стрептомицину, гентамицину, тетрациклину. Штамм проявляет устойчивость к этим антибиотикам в широких границах изменения от концентрации бактерий.

Обсуждения. Исследуемый штамм *B.*

subtilis обладает характеристиками микроорганизма, обладающего выраженной антагонистической активностью по отношению к наиболее распространенным возбудителям мастита и эндометрита у коров, таким как *Proteus vulgaris* и *Escherichia coli*, а также оказывает бактериостатическое действие на *Staphylococcus aureus*.

Проведённые исследования *in vitro* являются обоснованием применения исследуемого штамма *B. subtilis* в опытах *in vivo* в качестве экологического конкурента патогенной и условно-патогенной микрофлоры, вызывающих острый гнойно-катаральный эндометрит и острый катаральный мастит.

Список используемой литературы

1. Васильев В.Г. Факторы, обуславливающие возникновение мастита у коров / В.Г. Васильев // Ветеринария. – 1996. - №6. – С. 36-37.
2. Напримеров В.А. Микрофлора матки при гнойно-катаральных эндометритах у коров / В.А. Напримеров // Актуальные проблемы сельскохозяйственной экологии. – Новосибирск, 2004. С. 39-42.
3. Венцковский Б.М. Применение пробиотиков в комплексной терапии и профилактике воспалительных заболеваний в акушерстве и гинекологии / Б.М. Венцковский, В.А. Товстановская // Методические рекомендации. Краснодар. 2009. – 23 с.
4. Ильинский Е.В. О некоторых последствиях лекарственной терапии, используемой в акушерско-гинекологической практике / Е.В. Ильинский // Тезисы международной конференции. – Рига. – 1997. – С. 68-70.
5. Клейко Е.И. Эффективность применения «Бацелла» в рационах коров / Е.И. Клейко // Эффективное животноводство. №8. – 2009. - С. 23-24.
6. Топурия Г.М. Влияние антропогенных факторов на воспроизводительную способность коров / Г.М. Топурия, К.А. Вожжова // Современные проблемы вет. медицины: Матер. Всерос. научно-практ. конф. – Киров, 2006. – С. 70-71.
7. Gandhi A.B. Probiotics in veterinary use / Ganghi A. B. – Nagarathnam I. ff Poultry Guide. 1990: T. 27. N 3. – p. 43-49.
8. Denes S. Probiotics – past, present and future / Denev S. // Bulg. J. Agr. Sc., 1996. – Vol. 2, N 4. – P. 445-474.

МЕДИЦИНСКИЕ НАУКИ

АНАЛИЗ ВЫБОРА МЕТОДА АНЕСТЕЗИОЛОГИЧЕСКОГО ПОСОБИЯ ПРИ ОПЕРАЦИИ КЕСАРЕВО СЕЧЕНИЕ ОТДЕЛЕНИЯ АНЕСТЕЗИОЛОГИИ И РЕАНИМАЦИИ «КРАСНОЯРСКОЙ РБ».

Гасанов К.Г., Чаплыгин О.В., Тюякпаев А.Ш., Абдихаликов Ж.С.

«...»), «...»).

В течение последних лет отмечается снижение оперативных вмешательств при родах в Красноярской районной больнице. За отчетный период 2013 года проведено 73 оперативных вмешательств, а в 2014 году проведено 48 оперативных вмешательств. Данное снижение частоты операции кесарево сечение связываем в первую очередь с Приказом Министерства здравоохранения РФ от 1 ноября 2012 года № 572н "Об утверждении Порядка оказания медицинской помощи по профилю «акушерство и гинекология», а также с уменьшением показаний к операции кесарево сечение со стороны матери и плода, и направлено на снижение материнской и детской смертности в районах области. {3}

Целью исследования является анализ анестезиологических пособий при операции кесарево сечение, изучение структуры показаний к кесарево сечение, выполненных за отчетный 2014 год в ГБУЗ АО «Красноярская РБ».

Материалы и методы: Нами был проведен ретроспективный анализ всех случаев анестезиологических пособий во время операции кесарева сечения в ГБУЗ АО «Красноярская РБ» за период 2014г. Всего за указанный период времени было произведено 48 операций. За 2 года в ГБУЗ АО «Красноярская РБ» частота операции кесарево сечение снизилось с 73 случаев в 2013 г, до 48 случаев в 2014 г. При операции кесарево сечение использовали спинномозговую анестезию (СА) 22 случая и общую анестезию (ОА) по эндотрахеальной комбинированной

методике 28 случаев. {1}

Результаты и их обсуждение: При ранжировании в порядке частоты встречаемости показаний к кесареву сечению за отчетный период 2014 года получены следующие результаты: признаки внутриутробной гипоксии плода (14 случаев), послеоперационный рубец на матке (8случаев), затрудненные роды вследствие несоответствия таза и головки плода (7 случаев), тяжелая преэклампсия (3 случая), гипертонические, некоординированные и затянувшиеся сокращения матки (5 случаев), преждевременная отслойка плаценты (4 случая), затрудненные роды вследствие неправильного положения или предлежания плода (4 случая), крупный плод(1 случай), затрудненные роды вследствие аномалии органов таза у матери (1 случай), миопия высокой степени (1 случай). {2}

Возраст рожениц колебался от 16 и до 41 лет. Из них первородящих были 38% (19 случаев) женщин, повторнородящих – 26%(12 случаев) и многорожавших (17) родов – 36%. Всем пациенткам за изученный период кесарево сечение произведено в экстренном и срочном порядке по показаниям – 48(100%) рожениц {4}. Кесарево сечение в сроках беременности (38–42 недели) проводилось у 47 (98%) и при преждевременных родах – у 1 (2%). Необходимо отметить, что 22 (42%) операций выполнено под СА, а 26 (58%) операций – под общей анестезией (ОА).

Показаниями для ОА послужили: отказ роженицы от региональной анестезии

17 случаях (82 %), отслойка плаценты 4 случая (8%), критические состояния беременной, роженицы, связанные с преэклампсией, эклампсией 3 случая (6%), угрожающее состояние плода 2 случая (4%). {5}

С другой стороны, противопоказаниями для СА послужили: тяжелая гиповолемия 17 случаев (90%), прогрессирующее внутриутробное гипоксия плода 4 случая (8%), аллергическая реакция на местные анестетики 1 случай (2%) .{5}

Выводы:

1. Частота операции кесарева сечения в ГБУЗ АО «Красноярская РБ» за последние 2 года снизилось с 73 случаев в 2013 году до 48 случая в 2014 году.

2. Доля операции кесарева сечения, производимой при доношенной беременности, составляет 98% и при недоношенной 2%.

3. За отчетный 2014 год кесарево сечение произведено в срочном и экстренном порядке по показаниям – 48 (100%) рожениц.

4. Спинальная анестезия является безопасным, надежным и ведущим методом обезболивания и применяется в 42% случаев от общего количества

операций.

5. Выбором общей анестезии послужил отказ роженицы от региональной анестезии 17 случаях от общего количества общей анестезии и составляет 84%.

6. Методом выбора анестезиологического пособия при операции кесарева сечения в нашем учреждении остается спинномозговая анестезия.

Список литературы:

1. Пушкарев А.С. Анестезиология, реаниматология и интенсивная терапия. Учебное пособие. Астрахань, 2008 г. 198 с.

2. Пушкарев А.С., Парфенов Л.Л. Реаниматология. Учебное пособие. Астрахань, 2007 г., 216с.

3. Айламазяна Э.К., Кулакова В.И., Радзинского В.Е., Савельевой Г.М. Акушерство, национальное руководство. Москва, 2009 г., 1200 с.

4. Мишель Оден «КЕСАРЕВО СЕЧЕНИЕ: Безопасный выход или угроза будущему?». Москва, 2006 г. 97 с.

5. Сумин С.А. Анестезиология и реаниматология 2 том. Москва, 2010 г., 869 с.

ОСОБЕННОСТИ ИНТЕЛЛЕКТА У МЕДИЦИНСКИХ РАБОТНИКОВ, СКЛОННЫХ К РИСКОВАННОМУ ПОВЕДЕНИЮ

*Миронова Ю. В. *, Гончаров Г. В. **, Кудрин Р. А. ***, Болотова С.Л. *****

* « », .
 ** « », .
 *** « », .
 **** « », .

3 25 40 .
 (EQ), (IQ), -

(15 %)

11,4 %

(EQ), 8,3 %
IQ

EQ, 21,7 %

Summary.

Purpose. Set patterns of intelligence influence on medical workers (n=48) stem s

Результаты из табл. 1 показывают, что итоговый результат теста на склонность к рискованному поведению для группы с максимальной склонностью к риску достоверно больше, чем для группы умеренного риска на 26,5 % ($p \leq 0,05$). Также результат теста в группе умеренного риска больше соответствующего результата в группе с минимальным риском на 32,5 % ($p \leq 0,05$). Это показывает возрастание показателей риск-теста при переходе от группы минимального риска к группе

Таблица 2

Показатели эмоционального и психометрического интеллекта в группах обследованных с различной склонностью к риску (t-критерий Стьюдента)

Группы риска	Группа минимального риска M±m (n=86)	Группа умеренного риска M±m (n=96)	Группа максимального риска M±m (n=32)
EQ общий	30,4 ± 0,39	113,2 ± 3,38**	127,8 ± 1,92
EQ внутренний	37,2 ± 0,29	37,2 ± 0,29	37,3 ± 0,29
EQ социальный	35,7 ± 0,57	35,6 ± 0,55**	38,8 ± 0,87
EQ экзистенциальный	33,6 ± 0,51	33,9 ± 0,48	34,0 ± 0,84
IQ общий	107,3 ± 2,75*	34,5 ± 0,91**	71,9 ± 8,76
IQ логический	7,5 ± 0,27*	7,6 ± 0,26	7,7 ± 0,45
IQ вербальный	14,8 ± 0,42*	12,2 ± 0,42	12,4 ± 0,72
IQ математический	5,6 ± 0,19*	6,9 ± 0,25**	5,4 ± 0,32

* Достоверные различия с группой максимального риска ($p \leq 0,05$).

** Достоверные различия с группой минимального риска ($p \leq 0,05$).

По данным табл. 2 видно, что 51,4 % от всех обследованных составили лица со средним показателем EQ. Между группой с максимальной склонностью к риску и группой с умеренной склонностью к риску достоверные отличия выявлены по уровню общего EQ, социального EQ и математического IQ.

Показатель общего EQ в группе максимального риска ($127,8 \pm 1,92$) достоверно, больше чем в группе умеренного риска ($113,2 \pm 3,38$) на 11,4 %. Показатель социального EQ в группе максимального риска ($38,8 \pm 0,87$) достоверно больше, чем в группе умеренного риска ($35,6 \pm 0,55$) на 8,3 %.

В группе максимального риска показатель общего IQ достоверно больше на 52,1 %, а математического IQ – достоверно ниже на 21,7 % по сравнению с группой умеренного риска ($p \leq 0,05$).

Также, достоверные отличия выявлены между группой лиц, склонных к умеренному риску и группой минимального риска по уровню общего IQ. В группе лиц,

умеренного риска, а также, но менее значительно, при переходе от группы с умеренной склонностью к риску к группе с максимальной склонностью к рискованному поведению.

В табл. 2 отражены показатели определения достоверности различий по уровню эмоционального и психометрического интеллекта между группами лиц с различной склонностью к риску.

склонных к минимальному риску, показатель общего IQ оказался достоверно больше, чем в группе лиц, склонных к умеренному риску на 67,8 %. Показатели логического IQ в группе минимального риска были достоверно меньше на 1,3 % по сравнению с группой умеренного риска. В группе минимальной склонности к риску показатель вербального IQ оказался на 17,6 % достоверно больше по сравнению с группой умеренного риска и на 18,8 % достоверно меньше математического IQ ($p \leq 0,05$).

Выводы.

По данным исследования было выявлено, что лица, склонные к риску, составляют 15 % от общего числа обследованных врачей. В то же время медицинские работники с умеренной склонностью к риску и минимальной склонностью к риску составляют 45 % и 40 % обследованных, соответственно.

Наличие более высокого общего уровня эмоционального интеллекта характерно для лиц, склонных к

максимальному риску (на 11,4 %), и в частности уровня социального EQ, который на 8,3 %, выше, чем в группе умеренного риска. По-нашему мнению, это обусловлено тем, что в условиях риска у медицинского работника возникает необходимость задействовать все механизмы адаптации для достижения наиболее благоприятного исхода. В условиях ургентной ситуации для принятия правильного решения, кроме

Список литературы

1. Беар, Ж.-М. Два теста: узнайте ваши IQ и EQ / Ж.-М. Беар, Н. Евсикова, К. Андре, К. Киселева // Psychologies (приложение), 2007. – № 18. – С. 24-33.

2. Кленова, М. А. Ценность и мотивация риска у представителей разных

личных знаний медицинский работник вынужден опираться на действия и эмоциональные проявления других участников данных обстоятельств с помощью эмоционального интеллекта.

Полученные результаты являются дополнением к физиологической интерпретации понятия эмоционального интеллекта, традиционно используемого в практике профессионального отбора.

поколений / М. А. Кленова, Р. М. Шамионов // Вестник Костромского гос. ун-та им. Н.А. Некрасова [серия психологические науки]: Акмеология образования, 2009. – Т. 15. – №3. – С. 60-63.

ОСОБЕННОСТИ ИНТЕЛЛЕКТА У ОПЕРАТОРОВ С РАЗЛИЧНЫМ ХРОНОТИПОМ

*Плотникова А.В. *, Кудрин Р.А. ***

*

**

Резюме

19,7 %

14,15 %

INTELLIGENCE FEATURES OF OPERATORS WITH DIFFERENT CHRONOTYPES

*Plotnikova A.V. *, Kudrin R.A. ***

**Postgraduate student of Normal physiology department
Volgograd State Medical University
Volgograd*

***Doctor of Medical Sciences, Professor of Normal physiology department
Volgograd State Medical University
Volgograd*

ABSTRACT

In this article it has been demonstrated that people with the arhythmic chronotype are characterized by the presence by 19,7 % higher level of existential emotional quotient than in the group with the poorly expressed morning chronotype. In the group with the poorly expressed evening chronotype it has been revealed by 14,15 % higher level of inner emotional quotient than in the group with the arhythmic chronotype.

Key words: chronotype, emotional intelligence, operator activity.

Деятельность человека-оператора на сегодняшний день является одним из самых

сложных видов профессиональной деятельности [3]. Большая ответственность и высокая цена ошибок определяет необходимость предъявления достаточно высоких требований при профессиональном отборе лиц для операторских профессий.

Ни у кого не вызывает сомнений тот факт, что уровень интеллекта существенно влияет на эффективность профессиональной деятельности [8]. Различные модификации IQ-тестов широко используются в практике профессионального отбора. Однако в последнее десятилетие стала широко известна концепция эмоционального интеллекта, и ряд авторов считают, что коэффициент эмоционального интеллекта (EQ) имеет даже большую прогностическую ценность, чем IQ [5]. Особое значение этот факт обретает во внештатных ситуациях, когда оператор действует, подчиняясь эмоциям, а не логике [7].

Изучение влияния биоритмологических особенностей на психофизиологический статус человека также является одной из ключевых проблем современной хронофизиологии, а также эргономики и организации труда [2, 4]. Определение принадлежности к тому или иному хронотипу позволяет оценить, в какое время суток оператор способен заниматься своей профессиональной деятельностью наиболее эффективно и с наименьшим количеством ошибок, а также выявить лиц, наиболее приспособленных к посменной организации труда [6, 9].

Таким образом, одним из первых шагов на пути профилактики аварийности является разработка рекомендаций по профессиональному отбору лиц для операторских профессий с учётом биоритмологических и интеллектуальных особенностей.

Цель. Установить закономерности влияния биоритмологических особенностей на уровень эмоционального и психометрического интеллекта человека с последующей разработкой рекомендаций по профессиональному отбору лиц для операторских профессий.

Материалы и методы. В рамках данной работы было обследовано 47 человек, которые на момент включения в

исследование были в возрасте от 18 до 25 лет. По данным предварительного медицинского осмотра все обследованные были признаны относительно здоровыми.

Для определения хронотипа использовалась анкета Остберга в модификации С.И.Степановой (1989) [8].

Типологические особенности эмоционального интеллекта определялись по значениям эмоционального коэффициента (EQ), измеряемого с помощью адаптированной методики Ж.-М. Беар [1]. В последующем выделялись три уровня эмоционального интеллекта (высокий, средний, низкий), а также степень выраженности его составляющих (внутренний, социальный и экзистенциальный интеллект).

Исходный уровень психометрического интеллекта оценивался по значениям интеллектуального коэффициента (IQ) с помощью теста по Ж.-М. Беар [1]. По результатам теста также выявлялись три уровня психометрического интеллекта (высокий, средний, низкий), а также выраженность его составляющих (логический, вербальный и математический интеллект).

Результаты и обсуждение. Все участники исследования по результатам теста Остберга были разделены на четыре группы: 1) слабо выраженный утренний хронотип; 2) ритмичный хронотип; 3) слабо выраженный вечерний хронотип; 4) чётко выраженный вечерний хронотип.

Наибольшее количество обследуемых составили лица с ритмичным хронотипом – 72,3 %. 19,14 % обследуемых были отнесены к группе со слабо выраженным вечерним хронотипом. По 4,25 % пришлось на группы лиц со слабо выраженным утренним и с чётко выраженным вечерним хронотипом.

Распределение в выделенных группах отличалось от нормального по значениям эксцесса и асимметрии. В связи с этим, а также на основании небольшого количества обследованных лиц для выявления достоверности различий между группами был использован U-критерий Манна-Уитни. Данный показатель, являясь непараметрическим критерием, предназначен для оценки различий между двумя выборками по уровню какого-либо количественно признака и позволяет

выявлять различия между малыми выборками, когда $n_1, n_2 \geq 3$ или $n_1=2, n_2 \geq 5$.
 В табл. 1 представлены результаты теста Остберга в группах с различным хронотипом.

Таблица 1

Результаты теста Остберга в группах с различным хронотипом

(U-критерий Манна-Уитни)

Хронотипы	Слабо выраженный утренний хронотип M±m (n=2)	Аритмичный хронотип M±m (n=34)	Слабо выраженный вечерний хронотип M±m (n=9)	Чётко выраженный вечерний хронотип M±m (n=2)
Показатели теста Остберга				
Итоговый результат теста, баллы	84,0±1,00*	67,0±0,95**	51,6±1,42***	33,0±6,00

* Достоверные различия с

показателям психометрического интеллекта.

Выводы. В данном исследовании было выявлено, что лица, принадлежащие к аритмичному хронотипу, составляют максимальный процент среди обследованных – 72,3 %. В то время как лица со слабо выраженным вечерним хронотипом составили 19,14 % обследуемых, а лица со слабо выраженным утренним и с чётко выраженным вечерним хронотипом — по 4,25 %, соответственно.

Для лиц, принадлежащих к группе аритмичного хронотипа, характерно наличие на 19,7 % достоверно более высокого уровня экзистенциального эмоционального интеллекта, чем в группе слабо выраженного утреннего хронотипа.

Высокий уровень экзистенциального интеллекта позволяет человеку понимать и осознавать свои потребности, чувства и эмоции, делает его менее уязвимым для стресса, а также позволяет импровизировать и находить неожиданные и нестандартные выходы даже из самых сложных ситуаций, которые часто встречаются в операторской деятельности.

У лиц, принадлежащих к группе слабо выраженного вечернего хронотипа, выявлен в среднем на 14,15 % достоверно более высокий уровень внутреннего эмоционального интеллекта, чем в группе аритмичного хронотипа.

По-нашему мнению, высокий внутренний интеллект, как показатель эмоционального интеллекта, характеризующий отношение человека к самому себе, может дать оператору со слабо выраженным вечерним хронотипом преимущество в плане адаптации к психоэмоциональному стрессу во время операторской деятельности, так как высокий уровень эмоционального интеллекта помогает принимать верные решения во внештатных ситуациях, которые характерны для данного вида профессиональной деятельности.

Список литературы

1. Беар Ж.-М. Два теста: узнайте ваши IQ и EQ (Psychologies) // Ж.-М. Беар, Н. Евсикова, К. Андре, К. Киселева. – 2007. №

18 (приложение). – С. 24-33.

2. Бодров В.А. Актуальные проблемы психологии труда, инженерной психологии и эргономики // Институт психологии РАН. – 2011. – Выпуск 2. – 624 с.

3. Васильев А.В. Человеческий фактор как причина аварийности и травматизма на производстве и его анализ на основе принципов системного подхода к обеспечению безопасности / А.В. Васильев, Д.В. Аношкин // Безопасность труда в промышленности. – М.: ГУП «Научно-технический центр по безопасности в промышленности Гортехнадзора России», 2010. – № 11. – С. 22-25.

4. Волчек О.Д. Геокосмос и человек: монография. – СПб.: Изд-во РГПУ им. А.И. Герцена. – 2006. – С. 210-218.

5. Гоулмен Д. Эмоциональное лидерство: Искусство управления людьми на основе эмоционального интеллекта / Д. Гоулмен, Р. Бояцис, Э. Макки; Пер. с англ. – Москва: Альпина Бизнес Букс, 2005. – 301 с.

6. Душков Б.А. Энциклопедический словарь: Психология труда, управления, инженерная психология и эргономика / Б.А. Душков, А.В. Королёв, Б.А. Смирнов. – Издательство: Академический проект. – 2005. – С. 527-534.

7. Кудрин Р.А. Влияние эмоционального и психометрического интеллекта на эффективность работы операторов потенциально опасных объектов / Р.А. Кудрин // Вестник Волг. гос. мед. университета. – Волгоград: ВолгГМУ, 2011. – № 3. – С. 62-65.

8. Симоненко С.И. Вклад интеллектуальных способностей в успешность менеджера: взаимосвязь результатов тестов способностей и Центров оценки // Социальная психология и общество. – Москва: Московский городской психолого-педагогический университет, 2012. – № 1. – С.113-125.

9. Степанова С.И. Биоритмологические аспекты проблемы адаптации // Межвед. науч. совет АН СССР и АМН СССР по фундам. пробл. медицины. – М.: Наука, 1989. – 239 с.

ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ФОРМИРОВАНИЯ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ У ДЕТЕЙ С БРОНХООБСТРУКТИВНЫМ СИНДРОМОМ

Самигуллина Н.В.², Файзуллина Р.М.¹

¹ — ; ² —

155 . 65,8% . 3-4 62 .

« ».

Abstracts. The article presents data on the timeliness of diagnosis of bronchial asthma in 155 children. It was found that the late diagnosis was observed in 65.8% of cases. Term delay diagnosis was on average 3-4 years from the onset of the disease. On the basis of mathematical analysis of risk factors for bronchial asthma were selected 62 most important clinical and anamnestic features and developed an electronic computer program "Diagnosis of asthma in children."

Key words. Bronchial asthma, late diagnosis, risk factors, a computer program.

[1,2,3,6]. 3 50- 80% 6 [6,7,10]. [5,6,11]. [2,5,8,9].

Материалы и методы исследования. Проведен анализ медицинской документации 155 детей 5-15 лет с верифицированным диагнозом БА (основная группа) и 155 клинически здоровых детей 5-15 лет, перенесших в раннем возрасте бронхообструктивный синдром (контрольная группа).

Для установления предикторов БА у детей использованы данные амбулаторных карт (форм 112/у) и результаты обследования детей основной и контрольной групп. На первом этапе при сопоставлении данных основной и контрольной групп исследована диагностическая значимость отдельных клинических, анамнестических и параклинических признаков и их сочетания из числа простых и наиболее доступных на

амбулаторно-поликлиническом этапе здравоохранения, зарегистрированных в дебюте заболевания. При исследовании диагностической значимости отдельных признаков использовалась последовательная диагностическая процедура Вальда [4]. Затем была составлена таблица для прогнозирования БА у детей с применением последовательной диагностической процедуры, которая основана на сравнении отношений сравнений значений вероятностей комплекса наиболее существенных признаков с значением соответствующих им заранее определенных порогов [4]. На основе созданной таблицы была разработана электронная компьютерная программа «Диагностика бронхиальной астмы у детей». Программа

написана на языке программирования C++ для операционной системы Windows 95 и выше.

Статистическая обработка материала проводилась с помощью пакета прикладных программ «Statistica 6.0» (Statsoft).

Результаты и обсуждение. Средний возраст пациентов основной группы составил 11 [9; 12] лет, контрольной группы- 11 [10; 12] лет. По полу в исследуемых группах распределение оказалось следующим: в основной группе было 86 (55,5%) мальчиков и 69 (44,5%) девочек, в контрольной группе- 78 (52,7%) и 70 (47,3%) соответственно. Таким образом, группы пациентов были

сопоставимы по полу и возрасту.

При анализе медицинской документации пациентов основной группы было установлено, что своевременно диагноз БА был установлен лишь 53 (34,2%) детям, у 102 (65,8%) пациентов был определен срок запаздывания диагноза. Срок запаздывания постановки диагноза варьировал от 6 месяцев до 9,5 лет от начала клинических проявлений заболевания (рис.1). Средний срок запаздывания постановки диагноза составил 4 [2; 5] года. Средний возраст детей на момент фактического установления диагноза составил 6 [4; 7] лет.

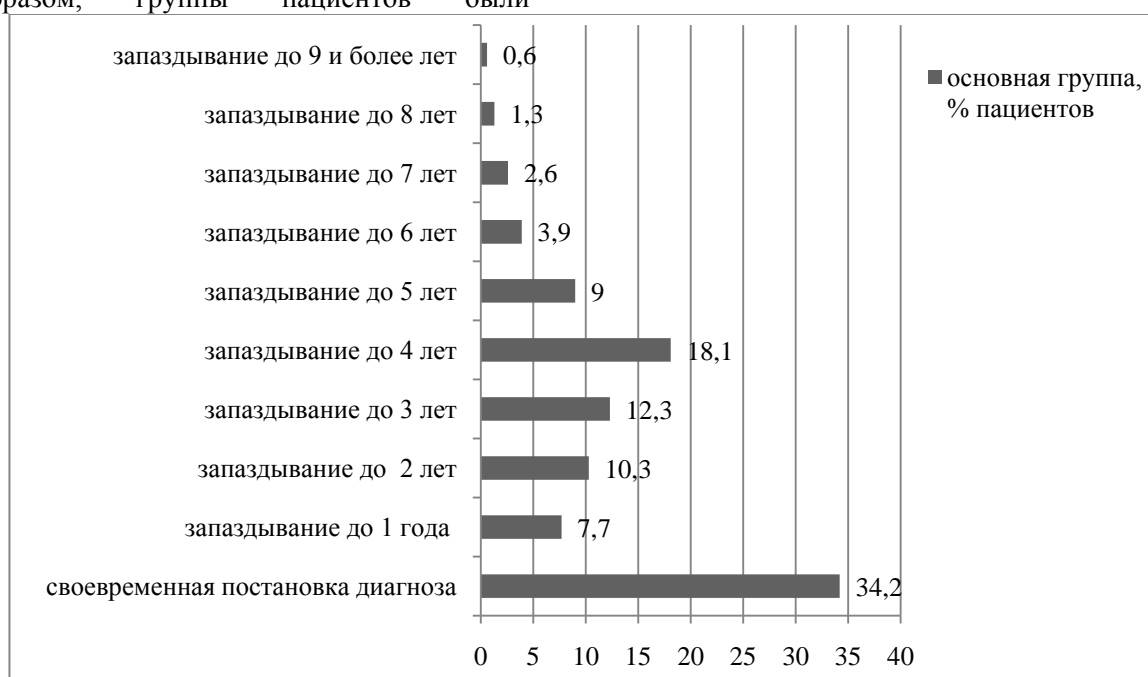


Рисунок 3.1. Сроки постановки диагноза БА детям основной группы.

Полученные данные наглядно демонстрируют, что наиболее часто постановка диагноза БА отстает на 3-4 года от начала клинических проявлений заболевания.

В нашем исследовании были проанализированы 62 клинических и анамнестических признака в основной и контрольной группах детей. Для оценки эффективности методики были определены показатели, используемые в современной медицинской статистике: чувствительность (Se), специфичность (Sp), прогностическая значимость положительного результата (PVP), прогностическая значимость отрицательного результата (PVN) и диагностическая эффективность (ДЭ).

Из числа анамнестических признаков,

обладающих высокой диагностической ценностью были включены следующие признаки: отягощенность по аллергическим заболеваниям и/или БА со стороны матери; осложненное течение беременности и родов- экстрагенитальная патология матери, кесарево сечение, асфиксия и ИВЛ при рождении; искусственное вскармливание и необоснованно раннее введение прикормов в рацион ребенка; атопический дерматит с началом проявлений до 1 года и старше 1 года, пищевая аллергия, ринит, конъюнктивит и заложенность носа без ОРВИ; неблагоприятное экологическое микроокружение детей; вирусные инфекции с частотой более 4 в год; возраст дебюта клинических симптомов до 1 года

или старше 3 лет; частота эпизодов бронхиальной обструкции более 3 раз за год; связь появления респираторных симптомов с действием аллергенов; наличие или отсутствие нарушений ФВД по данным спирометрии, эозинофилии в периферической крови и риноцитогамме, а также уровень общего IgE.

На основе анализа таких показателей как отношения шансов (ОШ) и информативности каждого признака были рассчитаны диагностические коэффициенты (ДК) наиболее значимых признаков. На основе полученных данных была разработана электронная компьютерная программа для оценки прогноза формирования БА у детей. Программа апробирована на 68 детях с бронхообструктивным синдромом. По итогам у 32 детей был получен результат высокой вероятности формирования БА. Данный диагноз был подтвержден в результате обследования и верифицирован в соответствии с критериями международных согласительных документов по БА у детей.

Были рассчитаны характеристики метода: Se- 93,8%, Sp- 88,9%, PVP- 88,2%, PVN- 91,4%, т.е. предложенная методика обладает достаточно высокими показателями чувствительности и специфичности.

Программа была внедрена в работу детских амбулаторно-поликлинических учреждений города.

Таким образом, остается актуальной проблема поздней постановки диагноза БА у детей. Своевременно диагноз был установлен лишь в трети случаев (34,2%), у остальных 65,8% пациентов диагноз запаздывал в среднем на 3-4 года от начала заболевания. По результатам математического анализа были отобраны наиболее значимые клинико-анамнестические признаки и составлена таблица для прогнозирования формирования БА у детей. На основе прогностической таблицы была разработана программа «Диагностика бронхиальной астмы у детей». Методика обладает высокими показателями чувствительности и специфичности.

Литература

1. Балаболкин И.И. Актуальные проблемы аллергологии детского возраста на современном этапе/ И.И. Балаболкин// Педиатрия.- 2012.- Т.- 91.- №3.- С. 69-75.
2. Геппе Н.А. Актуальность проблемы бронхиальной астмы у детей/ Н.А. Геппе// Педиатрия.- 2012.- Т.- 91.- №3.- С. 76-82.
3. Глобальная стратегия профилактики и лечения бронхиальной астмы, пересмотр 2014 г. Перевод с англ./ Российское респираторное общество.- М.: 2014, 141 с.
4. Дашутина Е.В., Блощицкий В.П. Разработка и реализация алгоритма оценки информативности признаков при диагностике заболеваний. Точка доступа: <http://www.masters.donntu.edu.ua/2012/fknt/dashutina/library/article2.htm> (дата обращения 12.11.2014).
5. Намазова-Баранова Л.С. Аллергия у детей: от теории к практике/ Л.С. Намазова-Баранова.- М.: «ПедиатрЪ», 2011.- 668 с.
6. Национальная программа «Бронхиальная астма у детей. Стратегия лечения и профилактика». 4-е издание, испр. и доп./ Российское респираторное общество.- М.: 2012, 174 с.
7. Овсянников Д.Ю. Бронхиальная астма у детей первых пяти лет жизни/ Д.Ю. Овсянников, Т.Б. Оболадзе, Н.И. Петрук// Аллергология и иммунология в педиатрии.- 2011.- №3.- С. 23-37.
8. Трудности диагностики и лечения бронхиальной астмы у детей первых пяти лет жизни/ Н.Г. Астафьева, Д.Ю. Кобзев, Е.Н. Удовиченко [и др.]// Лечащий врач.- 2011.- №1.- С. 21-27.
9. Developing an interactive story for children with asthma/ Т.Н. Wyatt, X. Li, Y. Huang [et al.]// Nurs Clin North Am.- 2013.- Vol. 48(2).- P. 271-285.
10. Environmental risk factor assessment: a multilevel analysis of childhood asthma in China/ F. Li, Y.C. Zhou, S.L. Tong [et al.]// World J Pediatr.- 2013.- Vol. 9(2).- P. 120-126.
11. Improving pediatrician knowledge about environmental triggers of asthma/ J.R. Roberts, C.J. Karr, L. de Ybarrondo [et al.]// Clin Pediatr (Phila).- 2013.- Vol. 52(6).- P. 527-533.

АНАТОМИЧЕСКИЕ И КЛИНИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ХРОНИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ВЕН. ОБЗОР ПРОБЛЕМЫ.

Фаттахов. В.В.

«

»

12 - 18

4-7

(100) 22

7 12

VenoScan

" "

()

()

;

;

;

Abstract

Pressure in the venous part of the capillary by an average of 12 - 18 mm Hg falls to 4-7 mm Hg at the right atrium. In the supine position gravitational pressure neutralized and blood flows by the rules of the dynamic pressure gradient. Respiratory motion also actively influence the venous return of blood.

High blood pressure in the venous system, generating in the standing position and at rest (approximately 100 mm Hg, depending on height) is about an average of 22 mm Hg ranging from 7 to 12 steps. Similar changes of the pressure are observed in the flexion of the foot, and during the rise on tiptoe - in the forefoot.

Scanning the veins on the VenoScan unit allows to objective evaluation of veno-muscular pumps and valves work and deep vein of the shin. The repeated study after using medical compression hosiery shows the effectiveness of compression and therapy.

An effective way to reduce the diameter of the superficial and deep veins, to lower pathological venous "capacity" of the lower extremities, to reestablish the functional recovery ability of insufficient valve system, to improve the muscle pump of extremities, first of all of the shins, is wearing the compression hosiery. This also helps to increase the resorption of interstitial fluid, to reduce swelling of the feet soft tissues, to reduce the permeability of the venous wall and increased fibrinolytic activity of blood.

Key words: anatomy of the venous system; chronic disease of the veins; valve insufficiency; veins scanning; medical compression hosiery; the study of microcirculation

Значительный опыт работы в системе последипломного образования врачей показывает, что периодическое восстановление и восполнение знаний по клинической анатомии (анатомии для врачей!) физиологии, патофизиологии венозной системы и венозного кровообращения, а также рассмотрение вопросов коррекции основных нарушений, является актуальным. Венозная система, во многих отношениях более сложная, чем

артериальная и глубокое понимание анатомии, физиологии, патофизиологии, и доступных диагностических тестов необходимо в лечении острых и хронических венозных расстройств [20, 22].

Почему течет кровь в сосудах? Что способствует? Что мешает? Основными факторами являются: гидростатическое давление, осмотическое и онкотическое давления, состояние микроциркуляторного русла, эндотелия сосудов, системы

гемостаза и двигательная активность человека.

Эффективный венозный возврат из нижних конечностей требует взаимодействия сердца, градиента давления, работы мышечной помпы (мышечного насоса) ног и состоятельности венозных клапанов.

Давление в венах в норме колеблется в пределах от 5 до 25 мм рт. ст. и отражает большую емкость венозной системы. Заполнение вен изначально сопровождается пассивным накоплением крови в спавшихся венах, далее происходит расправление вен, они приобретают округлую форму, в них значительно повышается давление, особенно в положении стоя [24].

Регуляции тонуса вен является важным аспектом венозной гемодинамики и работает во взаимодействии с артериальным тонусом, величиной сердечного выброса. Симпатическая регуляция тонуса гладких мышц сосудов выражена в чревных и кожных сосудах [1].

Сердечно-сосудистый гомеостаз при вертикальном положении тела в значительной степени достигается путем непосредственного изменения деятельности сердца, последующей корректировки артериального сопротивления – снижение артериального давления от сердца к капиллярам в резистивных сосудах, т.е. в мелких артериях и артериолах [27, 30]. Остаточное давление определяет венозный отток, и в тоже время депонирование крови в венах. Так, в зависимости от положения тела и мышечной нагрузки, от 60% до 80% от объема крови (70 мл / кг у мужчин, 65мл / кг у женщин) находится в венозной системе. 25-50 % от этого объема находится в посткапиллярных венулах и их системе сбора. Приблизительно 25% (18 мл / кг) находится в чревной сети. Это количество меняется в зависимости от положения тела, двигательной активности ног и времени суток [16].

Кровь движется через артерии и вены из-за динамического давления, полученного за счет насосного действия сердца. В замкнутой системе кровообращения, венозный возврат должен быть равен сердечному выбросу. Большинство динамического давления рассеивается в артериальной

части системы кровообращения. Оставшаяся энергия высвобождается в венозной системе. При нормальных обстоятельствах, давление в среднем от 12 - 18 мм рт.ст. в венозном конце капилляра падает к правому предсердию до 4-7 мм рт. ст. В положении на спине гравитационное давление нейтрализуется и кровь течет по правилам динамического градиента давления. Дыхательные движения также активно влияют на венозный возврат крови. Но в положении стоя последний эффект значительно снижается.

Это факт подтверждает правильность рекомендаций для пациентов с ХВН о необходимости лежать с приподнятыми на валик ногами (20-30 см в диаметре) и выполнять упражнения, направленные на сокращение мышц ноги в положении лежа, а также дыхательную гимнастику. Полезным оказывается положение «сидя», когда ноги положены на соседний стул, но здесь сохраняется определенное гравитационное сопротивление, которое необходимо преодолеть потоку крови. Противопоказано положение «нога на ногу», особенно при наличии предрасполагающих к развитию ХЗВ факторов, а также предменструальный период и критические дни, когда увеличен уровень прогестерона в организме женщины, а также любые проявления ХОЗАНК [6].

Венозный возврат из вен нижних конечностей достигается выбросом крови мышечной помпой голени при полноценно функционирующих (компетентных) венозных клапанах. Клапаны разделяют гидростатический столб крови на сегменты и предотвращают ретроградный кровоток в венах [8, 14]. Наибольшее функциональное значение имеют подколенные и дистальные клапаны. Большое число клапанов в подколенном сегменте предполагает их большую функциональную значимость. Несостоятельность клапанов ведет к значительному изменению гидростатического давления.

Клапаны перфорантных вен предотвращают рефлюкс из глубоких вен в поверхностные. В то же время, концепция последовательного сдавливания вен мышечной помпой и движения крови в голени предусматривает двунаправленный

поток крови и соответственно двунаправленная работа клапанов перфорантных вен считается нормальной. Мышечный насос нижних конечностей включает мышцы стопы, голени и бедра. Среди них, насос икроножных мышц является наиболее важным, так как он наиболее эффективный, имеет крупнейшие емкости и создает высокое давление – до 200 мм ртутного столба во время мышечного сокращения [19].

Нормальный объем всей голени колеблется от 1500 до 3000 см³, а объем венозной крови от 100 до 150 см³. От 40% до 60% объема венозной крови выбрасывается при единичном сокращении мышц голени [9,11,19]. Во время сокращения икроножной и камбаловидной мышц, кровь с определенной силой выбрасывается в подколенную и бедренные вены. Клапаны предотвращают ретроградный рефлюкс во время последующей релаксации, при котором в венах голени создается отрицательное давление. При этом в голени кровь из поверхностных вен поступает в глубокие системы через компетентные перфорантные вены.

Несмотря на то, что на бедре вены окружены мощными мышцами, вклад последних в венозный возврат незначительный, по сравнению с мышечной помпой икроножных мышц. Подошвенное венозное сплетение сжимается во время передвижения человека. Это насосное действие идет на заполнение поверхностных и глубоких вен голени [19].

Венозная подошвенная сеть формируется из венозных “озер” подошвы стопы [3]. При ходьбе данная венозная дуга сжимается, и кровь проталкивается к началу двух систем венозного возврата. Сокращение времени ходьбы, нарушение ее характера в результате изменения способа постановки стопы (биомеханики шага), длительное пребывание в положении стоя неизбежно приводят к прекращению кровотока в подошвенной дуге. Это явление усугубляется тем фактом, что тыльный и подошвенный кровотоки сообщаются посредством бесклапанных вен перфорантов. Больше использование одной конечности по сравнению с другой имеет следствием слишком сильное или слабое сдавление подошвенной дуги. [4,5,7,

32]

В отношении мышечного “насоса” необходимо помнить аксиому: ток крови, направленный к центру, открывает клапаны; ток крови, направленный от центра, закрывает клапаны. Высокое давление крови в венозной системе, формирующееся в положении стоя и в покое (примерно 100 мм рт.ст. в зависимости от высоты), разрешается в среднем до 22 мм рт.ст. при ходьбе, достаточно от 7 до 12 шагов [27]. Аналогичные изменения давления наблюдаются при подошвенном сгибании стопы, при подъеме на цыпочки – на передние отделы стопы [23, 27]. Эти исследования отвечают на вопрос: «Ходить или не ходить пациентам при варикозной болезни?». Более того, подтверждают важность лечебной физкультуры.

Состояние микроциркуляции в конечности, в том числе при ХВН можно определять методом лазерной доплеровской флоуметрии [5]. Венозное давление в движении Ambulatory venous pressure (далее AVP) можно определить инвазивно с помощью 21-иглы [23] или неинвазивно [11, 15, 21].

Анализ кардиоинтервалограмм (КИГ) с ортостатической пробой позволяет оценить функциональный резерв симпатического и парасимпатического отделов автономной нервной системы, соответственно состояние системного кровообращения. [1]. Проба заключается в том, что после 5-минутного периода отдыха в положении лежа на спине, испытуемый встает и сохраняет вертикальную позу 7 минут. Первая реакция заключается в депонировании венозной крови в нижних конечностях и развития компенсаторной активации симпатической нервной системы. Следствием этого является развитие тахикардии и увеличение артериального давления. Однако, при наличии венозной недостаточности или выраженной нейропатии с повреждением симпатического отдела автономной нервной системы (СД- 2 типа) возможно развитие гипотонической реакции на ортостатическую пробу. Вслед за активацией симпатической нервной системы увеличивается активность парасимпатического отдела, что вызывает нормализацию частоты пульса и

артериального давления. При проведении подобных исследований у лиц старшей возрастной группы, особенно имеющих в анамнезе ТИА, ОНМК, ИБС, ПИКС, ожирение 1-3 степени, СД 2 типа в стадии суб- или декомпенсации, после 5-минутной записи КИГ в положении лежа на спине, испытуемый садится и запись продолжается еще 5 минут.

Динамика активности автономной нервной системы находит свое отражение в характерных изменениях спектра variability сердечного ритма. Нормальная реакция на ортостатическую пробу проявляется относительным увеличением LF компонентов спектра сердечного ритма [2].

Одним из современных методов исследования является VenoScan [5, 21] Беспроводная система LRR на основе новейших Bluetooth технологий позволяет получить два результата: период венозного наполнения и силу работы венозной помпы (Рис. 1). Определяется отклонение от нулевого значения в процентах (ось Y) в течение времени (ось X). Чем меньше

крови находится в венах, тем выше процент отклонения. Измерение разделено на 3 фазы:

1. Предварительная фаза выталкивания крови (T_c). Определяется нулевое значение. Все дальнейшие измерения, как относительные значения, к этому нулевому значению.

2. Фаза выталкивания (T_p). В этой фазе пациент качает кровь от вен, сгибая стопы. Если мускульный насос функционирует правильно, то относительное значение достигает максимального уровня R_{max} .

3. Вторичное наполнение (T_0). Наблюдается относительное снижение значения до окончательного значения R_{end} .

4. В случае здоровых вен период венозного наполнения T_0 находится в диапазоне 24 с; после 40 с измерение останавливается (окончательное значение T_0 должно быть 40 с).

5. Амплитуда R_{end} располагается около нулевой линии, определенной R_{start} .

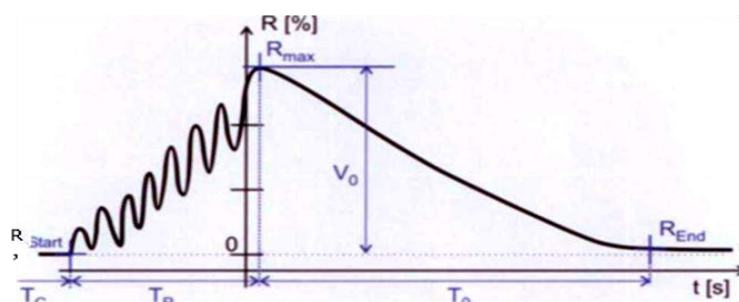


Рис. 1. Сила работы венозно-мышечной помпы и время наполнения кровью вен голени.

Согласно международной системе, есть три степени венозной недостаточности на основе T_0 : ≥ 25 с - нормальное значение (вены здоровы)

24 с ... 20 с – расстройство венозного оттока I степени (легкое)

19 с. .. 10 с - расстройство венозного оттока II степени (среднее)

≤ 9 с - расстройство венозного оттока III степени (тяжелое)

Сила венозной помпы V_0 в %. Наивысшее значение достигается к концу фазы выталкивания в % (R_{max}): $>3\%$ - нормальное состояние (вены в здоровом состоянии);

$<3\%$ - патология (имеется в виду, что мышечная помпа ослаблена).

Хроническая венозная недостаточность (ХВН) определяется как двигательная венозная гипертензия, не разрешающаяся при сокращении мышечной помпы ног. При нормальных обстоятельствах, венозные клапаны и мышечные помпы нижних конечностей определяют предел накопления крови в венах нижних конечностей. Нарушение оттока крови из нижних конечностей за счет препятствия потоку крови (тромб и др.), мышечно-фасциальная слабость, потеря синхронного механизма сокращения мышц или клапанная недостаточность ведут к периферийной венозной недостаточности [9,23,26].

Клапанная недостаточность ведет к

лимфооттока;

- купирование воспалительных реакций.

Независимо от наличия и выраженности ХВН все пациенты нуждаются в устранении факторов риска заболевания. Объем лечебных мероприятий зависит от степени ХЗВ;

Участники Сопещения считают, что эластическая компрессия должна быть обязательным компонентом любых лечебно-профилактических мероприятий при варикозной болезни вен нижних конечностей. Терапевтический эффект компрессионного лечения определяется следующими доказанными механизмами действия:

- уменьшением диаметра поверхностных и глубоких вен, снижением патологической венозной "емкости" нижних конечностей;

- улучшением функциональной способности недостаточного клапанного аппарата;

- улучшением (восстановлением) работы мышечной помпы конечностей, в первую очередь голени;

- возрастанием резорбции тканевой жидкости в венозном колене капилляра и снижением ее фильтрации в артериальном и соответственно уменьшением отека мягких тканей ног;

- снижением проницаемости венозной стенки.

- увеличением фибринолитической активности крови.

Основным гемодинамическим результатом правильно подобранной программы компрессионного лечения является нормализация функции мышечно-венозной помпы нижних конечностей с улучшением гемореологии и микроциркуляции. При механическом сдавлении расширенных вен происходит сужение ее просвета, восстановление соприкосновения створок клапанов и их функции. Эластическая компрессия в зависимости от характера патологии и преследуемых целей может быть назначена на ограниченный или длительный срок.

Пациенты, которые не могут по тем или иным причинам (или не хотят) подвергнуться хирургическому лечению, должны носить компрессионный трикотаж,

практически в постоянном режиме. Поэтому очень важно его правильно подобрать по индивидуальному размеру и степени компрессии. Товар должен быть качественным. Принципиально важно не только назначать лечебный трикотаж, важно чтобы его носили, и он приносил удовлетворение!

На российском рынке представлены изделия отечественных (Финтекс, «ИНТЕРТЕКСТИЛЬ корп.» Россия) и ряда зарубежных производителей (Венотекс, США; Релаксан, Италия; Calse GT, Zanny и Podospecial, Италия; Веносан, Швейцария; Сигварис, Швейцария; Меди, Германия; Bauerfeind AG, Германия и др.),

- В Татарстане широкое распространение получили изделия фирмы Venotекс, представленной в России компанией Никамед. Некоторые пациенты жалуются, что трикотаж сложно носить летом, так как жарко и иногда возникает потница и раздражение кожи. Жалобы на то, что очень сильно давит, есть результат неправильного подбора трикотажа. Среди молодых пациенток важным моментом отказа от этих изделий является не достаточная эстетичность (красота) изделий и то, как они смотрятся на ногах.

Чувство дискомфорта преодолевается современными технологиями изготовления изделий [21]. Эти изделия отвечают изысканным потребностям современных леди, деловых людей, в том числе мужчин, спортсменов. Остановимся кратко на некоторых видах этих изделий, которые востребованы определенными слоями населения.

VenoTrain micro - «Модный компрессионный трикотаж». Матовый модельный трикотаж, содержит 50% микрофибры. Высокая воздухо- и влагопроницаемость, обладает антибактериальным действием благодаря включению ионов серебра в носочную часть изделия. Используется технология двойного обкручивания нити эластана. Класс компрессии Ccl 1 и Ccl 2, мягкий, комфортный на микро уровне. Легко одевается, оптимален для теплого и холодного времени года

VenoTrain micro balance - «Ухаживающий» компрессионный трикотаж». Содержит 50% микрофибры.

Ç €&°+ Ip% g ŠdŠX IP/ BvÇw R • 0 & 0

#ŠVW D PŠ°ZTRC BDD PŠ°WCP ĀŠXŠ RR 0 g f m)Š DŠ°PŠĀE P b Ç°p[hš&D Šy] @ñ`C%ŠZvÀ%'P°% ŠD` 0

À%# 0% k ÆÇP`R d ŠÀ(- P_0 ađ%²(Ā•Ā+y , Đ%`!à&@(kĀ` 0
d Š` 0 & •(à.đ*`Ç R€, _ç 0 Ç €.g P&2 0 °% WP&p&° Ā 0

Đ% P & p% x 7 Z • 0 p& m Pv\$ k b • 0 d € p% ² Ç P' € , b Ā+ ' 0

10. Cherry KJ, Gloviczki P, Stanson AW. Persistent sciatic vein: diagnosis and treatment of a rare condition.// *J Vasc Surg* 1996;23, P. 490-497.
11. Christopoulos DG, Nicolaides AN, Szendro G, Irvine AT, Bull ML, Eastcott HH. Air-plethysmography and the effect of elastic compression on venous hemodynamics of the leg.// *J Vasc Surg* 1987;5, P. 148-159.
12. Cotton LT. Varicose veins. Gross anatomy and development.// *Br J Surg* 1961;48, P. 589-597.
13. Gloviczki P. Vascular malformations.// In: Moore WS, editor. *Vascular and endovascular surgery: a comprehensive review*. 7th ed. Philadelphia: Saunders; 2005.
14. Goldman MP, Fronck A. Anatomy and pathophysiology of varicose veins.// *J Dermatol Surg Oncol* 1989; 15, P.138-145.
15. Hosoi Y, Zukowski A, Kakkos SK, Nicolaides AN. Ambulatory venous pressure measurements: new parameters derived from a mathematic hemodynamic model.// *J Vasc Surg* 2002;36, P.137-142.
16. Katz ML, Comerota AJ, Kerr RP, Caputo GC. Variability of venous hemodynamics with daily activity.// *J Vasc Surg* 1994;19, P.361-365.
17. Killewich LA, Macko RF, Cox K, Franklin DR, Benjamin ME, Lilly MP, et al. Regression of proximal deep venous thrombosis is associated with fibrinolytic enhancement.// *J Vasc Surg* 1997;26, P.861-868.
18. Lowell RC, Gloviczki P, Miller VM. In vitro evaluation of endothelial and smooth muscle function of primary varicose veins.// *J Vasc Surg* 1992;16, P. 679-686.
19. Ludbrook J. The musculovenous pumps of the human lower limb.// *Am Heart J* 1966;71, P.635-641.
20. Meissner Mark H., MD,a Gregory Moneta, MD,b Kevin Burnand, MD,c Peter Gloviczki, MD,d Joann M. Lohr, MD,e Fedor Lurie, MD,f Mark A. Mattos, MD,g Robert B. McLafferty, MD,h Geza Mozes, MD,i Robert B. Rutherford, MD,i Frank Padberg, MD,j and David S. Sumner, MD,h . Seattle, Wash; Portland, Ore; London, United Kingdom; Rochester, Minn; Cincinnati, Ohio; Honolulu, Hawaii; Seattle, Wash; Springfield Ill; Corpus Christi, Tex; and Newark, NJ
- The hemodynamics and diagnosis of venous disease. // *J Vasc Surg* 2007;. 46, P.4 - Motion is life: www.bauerfeind.com
21. Mozes G, Carmichael SW, Gloviczki P. Development and anatomy of the venous system.// In: Gloviczki P, Yao JST, editors. *Handbook of venous disorders*. 2nd ed. London: Arnold; 2001. p. 11-24.
22. Nicolaides AN, Hussein MK, Szendro G, Christopoulos D, Vasdekis S, Clarke H. The relationship of venous ulceration with ambulatory venous pressure measurements.// *J Vasc Surg* 1993; 17, P.414-419.
23. Nicolaides AN. Investigation of chronic venous insufficiency: a consensus statement// France, March 5-9, 1997. *Circulation* 2000;102, P.126-163.
24. Padberg FT, Jr., Johnston MV, Sisto SA. Structured exercise improves calf muscle pump function in chronic venous insufficiency: a randomized trial.// *J Vasc Surg* 2004;39, P.79-87.
25. Plate G, Brudin L, Eklof B, Jensen R, Ohlin P. Congenital vein valve aplasia.// *World J Surg* 1986;10, P.929-934.
26. Pollack AA, Wood EH. Venous pressure in the saphenous vein at the ankle in man during exercise and changes in posture.// *J Appl Physiol*, 1949;1, P.649-662.
27. Rose SS, Ahmed A. Some thoughts on the aetiology of varicose veins.// *J Cardiovasc Surg* 1986;27, P.534-543.
28. Rosfors S, Eriksson M, Leijd B, Nordstrom E. A prospective follow-up study of acute deep venous thrombosis using colour duplex ultrasound, phlebography and venous occlusion plethysmography.// *Int Angiol* 1997;16, P.39-44.
29. Shepherd JT. Role of the veins in the circulation.// *Circulation* 1966; 33, P. 484-491.
30. Travers JP, Brookes CE, Evans J, Baker DM, Kent C, Makin GS, et al. Assessment of wall structure and composition of varicose veins with reference to collagen, elastin and smooth muscle content. // *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1996;11, P. 230-237.
31. White JV, Katz ML, Cisek P, Kreithen J. Venous outflow of the leg: anatomy and physiologic mechanism of the plantar venous plexus.// *J Vasc Surg* 1996;24, P. 819-824.

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ КОМПЛЕКСНОГО ЛЕЧЕНИЯ ХРОНИЧЕСКОГО ГИПЕРТРОФИЧЕСКОГО РИНИТА

Эгамов С.Н.¹, Хушвакова Н.Ж.², Хайитов А.А.³

()
1 - II-
39/8. 140158
2 -
-1, .7
3 -

Summary. Chronic hypertrophic rhinitis lead to the breakdown of the normal functioning of the body because of a violation of respiratory function, leading to circulatory and tissue hypoxia, biochemical disturbances, including lipid metabolism and activity of the antioxidant system, which is accompanied by the development of the inflammatory reaction of the nasal mucosa; breach of natural immunity, as well as organic lesions of the paranasal sinuses, pharynx, larynx, lower respiratory tract. The examination and treatment of patients with chronic hypertrophic rhinitis who after surgical treatment along with conventional treatment included medication elfunat (ethylmethylhydroxypyridine succinate). Use of the drug has contributed elfunat: reduction of postoperative inflammatory reaction region and improve the activity of reparative tissue of the nose, the normalization of blood lipid peroxidation system and morpho-functional restoration layer of nasal mucosa.

Key words: chronic hypertrophic rhinitis, elfunat, lipoperoksidatsionnogo status blood antioxidant therapy.

Хронические гипертрофические риниты (ХГР) - одно из наиболее распространенных заболеваний среди ЛОР - заболеваний. Удельный вес хронических гипертрофических ринитов составляет около 60% от патологии носа [1,8]. Хронические гипертрофические риниты приводят к расстройству нормальной жизнедеятельности организма из-за нарушения функции внешнего дыхания, вызывающему циркуляторную и тканевую гипоксию, биохимические нарушения, в том числе липидного обмена и активности антиоксидантной системы, что сопровождается развитием

воспалительной реакции слизистой оболочки полости носа, нарушением естественного иммунитета, а также органическим поражением околоносовых пазух, глотки, гортани, нижних дыхательных путей [2,3].

В настоящее время оториноларингологи располагают обширным арсеналом различных методов хирургического лечения хронических гипертрофических ринитов, которые иногда бывают недостаточно эффективны, так как не позволяют восстановить носовое дыхание. При проведении хирургического лечения зачастую не учитывается

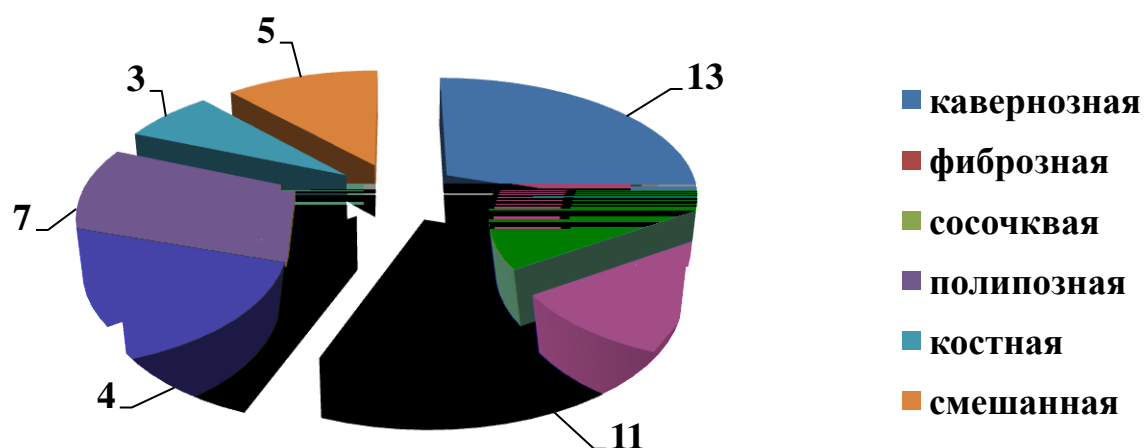
функциональное состояние слизистой оболочки полости носа и верхних отделов дыхательных путей, играющую важную роль в поддержании защитных способностей организма. В связи с этим поиск новых, более оптимальных методов комплексного лечения хронических гипертрофических ринитов представляет особую актуальность [3,8].

Материал и методы исследования.

В нашем исследовании приняли участие 43 больных в возрасте от 18 до 60 лет (30 больных - мужчины, 13 больных - женщины) с диагнозом хронический гипертрофический ринит. Основными жалобами больных были постоянное или периодическое затруднение носовых дыхание, выделения из носа, головная боль, нервные расстройства, гипосмия, снижение вкуса, гнусавость и понижение слуха. Всем пациентам проведены общепринятые клинические, параклинические и специальные методы исследования: осмотр,

термометрия, пальпация и перкуссия в проекции околоносовых пазух, оценка чувствительности в зонах иннервации ветвей тройничного нерва, передняя и задняя риноскопия, мезо- фарингоскопия, непрямая ларингоскопия, забор мазков из полости носа для микробиологического исследования, эндоскопическая риноскопия, исследование мукоцилиарного транспорта слизистой оболочки полости носа, рентгенография и компьютерная томография (по показаниям) носа и околоносовых пазух, клинические анализы крови и мочи, исследования липопероксидационного статуса крови электробиохимическим биосенсором, осмотр терапевта. На основании клинических обследований наших пациентов выявлено следующие формы ХГР: кавернозная (у 13 больных), фиброзная (у 11 больных), сосочковая (у 4 больных), полипозная (у 7 больных), костная (у 3 больных) и смешанная (у 5 больных).

Распределение больных по клиническим формам ХГР.



В зависимости от клинической формы проведены следующие виды хирургических вмешательств: вазотомия, подслизистая ультразвуковая дезинтеграция нижних раковин, щадящая шейверная конхотомия, остеоконхотомия под эндоскопическим наблюдением, латероконхопексия. Операции проведены под местной и общей анестезией в ЛОР отделении клиники Самаркандского Медицинского Института в период 2014-2015 годы. Все больные были разделены на 2 группы: основную (22 пациента) и контрольную (21 пациент). Больным основной группы после оперативного

лечения вместе с традиционным лечением был применён препарат Элфунат 2мл- 5% раствора в/м и путем вставление в нижней носовой ход марлевых турунд смоченных в смеси 2-мл 5% растворы Элфуната, 1-мл 2% новокаина и 1мл 5%- аскорбиновая кислоты на 1 час два раз в день на протяжении 10 дней. Больным контрольной группы после оперативного лечения было проведено традиционное лечение, которое включило в себя промывание носовой полости теплым физиологическим раствором, смазывание слизистой оболочки полости носа масляными растворами и сосудосуживающими средствами, удаление

корок.

Результаты и обсуждение: Анализ клинических эффективности препарата Элфунат оценивался на основании клинических (жалобы больного, состояние носового дыхания, состояние слизистой оболочки полости носа при передней задней и эндоскопической риноскопии) и общеклинических методов исследования (исследование состояния липопероксидационного статуса крови, путем определение уровня каталазы и супероксидазы в крови электробиохимическим биосенсором, оценка мукоцилиарного клиренса). У больных основной группы в результате применения препарата Элфунат (в/м введение и местное использование путем смазывания слизистой оболочки полости носа смесью 2 мл 5% раствор Элфуната, 1 мл 2% новокаина и 1мл -5% аскорбиновой кислоты) в послеоперационного периоде отмечалось улучшение носового дыхания на 2-3- день, уменьшились гиперемия и отек слизистой оболочки носа на 4 день, на 5-7 дней отсутствовали сухие корки и фибриновый налет в области

операционного раны; головная боль в области лба и ощущение тяжести в голове, нервные расстройства в виде усталости, утомляемости, нарушение сна, снижение памяти уменьшились на 7-8 сутки у большинства больных и отсутствовали через месяц при повторном осмотре. Понижение обоняние и вкуса восстановились, а гнусавость исчезла у большинства больных (90%) на 9-10 день от начало лечения и при повторном осмотре через 1 месяц больные таких жалоб не предъявляли. У больных контрольной группы получивших только традиционного лечение улучшение носового дыхания отмечалось только на 3-4- день, гиперемия и отек слизистая оболочки полости носа уменьшились только на 5 день, сухие корки и фибриновый налет в области операционной раны сохранялся даже на 7-8 сутки после оперативного вмешательства. Головная боль и тяжесть голове, нервные расстройства, снижение обоняние и вкуса у некоторых больных контрольной группы были сохранены даже при повторном осмотре через 1 месяц.

Клиническая характеристика основной и контрольной группы

Клинические параметры	Основная группа		Контрольная группа	
	В первые 10 дней после операции	Через 1 месяц после операции	В первые 10 дней после операции	Через 1 месяц после операции
Состояние носового дыхания	Улучшилось у 17 больных (77%)	Улучшилось у 22 больных (100%)	Улучшилось у 11 больных (52%)	Улучшилось у 19 больных (90%)
Состояние слизистой оболочки носа	Гиперемированная	Розовая	Гиперемированная	Бледно розовая
Наличие корок и выделений	Незначительные	Отсутствуют	Имеются	Незначительные
Головная боль	У 15 больных (68%)	Отсутствуют	У 16 больных (76%)	У 3 больных (14%)
Нервные расстройства	У 13 больных (59%)	У 1 больного (4%)	У 14 больных (66%)	У 6 больных (28%)
Снижение обоняние и вкуса	У 2 больных (9%)	Отсутствуют	У 3 больных (14%)	У 1 больного (4%)
Гнусавость	У 20 больных (90%)	Отсутствуют	У 19 больных (90%)	Отсутствуют

Элфунат, отмечена выраженная положительная динамика всех клинических показателей и собственной антиоксидантной системы, по сравнению с группой получавшей стандартное лечение. Это указывает на положительное влияние местной антиоксидантной терапии на состояние системы антиоксидантной защиты.

При применении местной антиоксидантной терапии Элфунатом в комплексе лечения ХГР достоверно ускоряется регресс воспалительных проявлений слизистой оболочки (отёк, гиперемия, патологическое отделяемое, затруднение носового дыхания), происходит функциональное восстановление (мукоцилиарный транспорт) слизистой оболочки полости носа.

Состояние липопероксидационного статуса крови и функции слизистой оболочки полости носа являются необходимым критерием выздоровления у данных больных. При этом уменьшаются сроки и стоимость лечения.

Проведенное нами исследование показало высокую клиническую эффективность препарата Элфунат и поэтому может быть рекомендован в комплексном лечении больных ХГР.

Список литературы

1. Пискунов Г. З., Пискунов С. З. Клиническая ринология., 2-е изд., - М. МИА 2006.. -164-216 с.

2. Смирнов Л.Д. Антиоксиданты гетероароматического ряда. Структура; активность, медицинское применение / Л.Д. Смирнов. 2 съезд Рос. науч. общ. фармакологов: Тез. докл. -М., 2003. - С.171.

3. Шахова Е. Г. Эффективность хирургических методов лечения хронических ринитов //Рос. ринолог. -2005. - №2. -С. 61.

4. Воронина Т.А. Антиоксидант мексидол. Основные нейрорепрессивные эффекты и механизм действия / Т.А. Воронина // Психофармакология и биологическая наркология. — 2001. — №1. — С.2-12.

5. Воронина Т.А. Актуальные направления применения антиоксиданта мексидола / Т.А. Воронина, Л.Д. Смирнов, К.М. Дюмаев // Свободные радикалы, антиоксиданты и болезни человека: Сб. тр. Нац. научно-практ. конф. с междун. участием. - Смоленск, 2001. - С. 191-193.

6. Гаврилов, В.Б. Метод исследования прооксидантной активности плазмы крови / В.Б. Гаврилов, М.И. Мешкорудная // Лабораторное дело. - 1983. -№3.- С. 33.

7. Лукьянова Л.Д. Современные проблемы гипоксии / Л.Д. Лукьянова // Вестник РАМН. - 2000. - №9. - С. 3-12.

8. Пискунов Г.З. Заболевания носа и околоносовых пазух: эндомикрохирургия / Г.З. Пискунов, С.З. Пискунов, В.С. Козлов и др. - М.: Коллекция «Совершенно секретно», 2003. - 208 с.

Фармацевтические науки

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСТАТОЧНОЙ ДНК ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА В БИОФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СУБСТАНЦИЯХ. ТАQМАН ИЛИ SYBR GREEN I?

Е. В. Ковалева^{1,2*}, А. П. Баранник², Е. Д. Шибанова², В.И. Швец¹

1-

2 . . . , 119571, , - , 86.

2

117997, , . . - , 16/10.

1.3

E.Coli BL21(DE3)/pINS07

1.3 *E.coli BL21/prhH1.3.*

DNA Extraction and Amplification Kit for the Measurement of Residual E.coli Host Cell DNA (#D415T, Cygnus Technologies).

1.3

(30),

E.coli (Cygnus Technologies).

Summary: The aim of research was design and subsequent application of the real-time PCR quantitative method for the determination of residual DNA of strains-producer in the active pharmaceutical substances of the recombinant human insulin and histon H1.3

Materials and methods. total DNA was extract from recombinant strain-producers of insulin E.Coli BL21(DE3)/pINS07 and histone 1.3 E.coli BL21/prhH1.3. Also was used commercial kit for real-time PCR quantitative method, DNA Extraction and Amplification Kit for the Measurement of Residual E.coli Host Cell DNA (#D415T, Cygnus Technologies).

Results. Designed primers for genome DNA strains-producers insulin and histon H1.3 was demonstrated the most sensitivity (30 times), in comparison with the commercial kit for identification of DNA E.coli (Cygnus Technologies).

Keywords: real-time PCR, histon, active pharmaceutical substance, residual DNA.

Введение. Для контроля степени чистоты и качества активных фармацевтических субстанций (АФС) необходимо развитие современных чувствительных методов определения специфических примесей, таких как остаточные белки и ДНК клеток-хозяина. Количество ДНК в АФС, предназначенных для производства инъекционных препаратов не должно превышать 10 нг/на терапевтическую дозу, согласно требованиям руководств EPh, FDA, ICH и WHO [1-4], а также согласно ФСП Р N002254/01-081209. Соответственно, не более 7-10 нг на 1 мг сухого вещества (7-10 ppb) для генно-инженерного инсулина. Для

рекомбинантного гистона H1.3 это значение составляет не более 5 пг на 1 мг сухого вещества (5 ppb). Были выбраны две вышеуказанные субстанции, поскольку допустимое содержание остаточной ДНК для них имеет различие в три порядка, это позволяет проводить оптимизацию метода при разных количествах определяемых примесей.

Целью исследования является разработка и последующее применение метода ПЦР в реальном времени для анализа остаточного содержания ДНК штаммов-производителей в фармацевтических субстанциях инсулина и гистона H 1.3.

Материалы и методы. Для

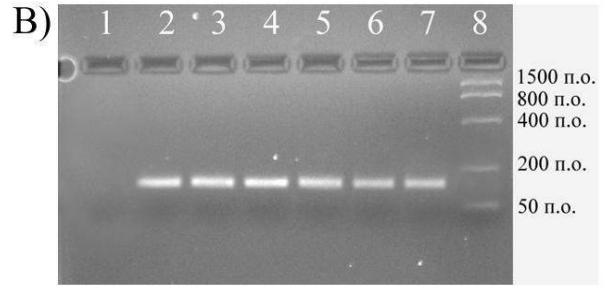
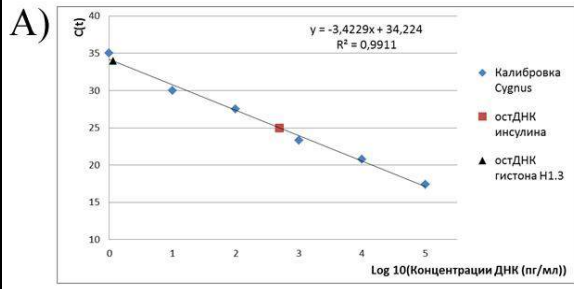
выделения тотальной ДНК были использованы штаммы-продуценты инсулина *E. Coli* BL21(DE3)/pINS07 (Патент №2267534 (версия 2), разработчик-ИБХ РАН, получен из музея штаммов-продуцентов ОБП ИБХ РАН), гистона H1.3 *E.coli* BL21/prhH1.3 (получен от ЗАО «Крионикс», РФ). Коммерческий набор для ПЦР в реальном времени, DNA Extraction and Amplification Kit for the Measurement of Residual *E.coli* Host Cell DNA (#D415T, Cygnus Technologies). В качестве объектов исследования были выбраны шесть протестированных ранее серий активной фармацевтической субстанции (АФС) инсулина и шесть серий АФС гистона H1.3, произведенных на ОБП ИБХ РАН. ПЦР в реальном времени с праймерами к 16S RNA *E.coli* и праймерами из коммерческого набора проводили на приборе «DT96» («ДНК-технологии», Россия). Концентрация праймеров составляла 5 пмоль/в реакцию. Реакционный объем 25 мкл. Программа 1 (праймеры к 16S RNA *E.coli*, 425 . .): 95°C 5 мин; 45 циклов: 95°C 30 сек, 60°C 70 сек. Программа 2 (праймеры к 16S RNA *E.coli*, 100 . .): 95°C 5 мин; 45 циклов: 95°C 30 сек, 58°C 40 сек. Условия амплификации, согласно руководству к коммерческому набору, программа 3: 95°C 10 мин; 45 циклов: 95°C 15 сек, 55°C 60 сек. Результаты оценивали при помощи программы Real_Time PCR v7.5, а также горизонтального агарозного электрофореза и визуализации в УФ диапазоне.

Результаты и обсуждение. Создание рабочего стандартного образца (PCO) на основе тотальной ДНК штамма-продуцента *E.coli*. Вследствие прохождения инсулином и гистона H1.3 множества технологических стадий, остаточная ДНК штамма-продуцента, присутствующая в фармацевтической субстанции, является

весьма гетерогенным материалом. Это «обрывки», фрагменты одно- и двухцепочечной ДНК, образовавшиеся в результате проведения технологического процесса, начиная от разрушения клеток штамма-продуцента до финишной очистки получаемого продукта. Применение ПЦР и ПЦР в реальном времени (рвПЦР) позволяют выявлять одно- и двухцепочечные фрагменты ДНК размером равным и большим выбранному для амплификации фрагменту. Поэтому в качестве положительного контроля необходимо использовать разрушенную ультразвуком тотальную ДНК штамма-продуцента.

Было проведено наращивание биомассы штамма-продуцента инсулина *E.Coli* BL21(DE3)/pINS07 и гистона H1.3 *E.coli* BL21(DE3)/prhH1.3. Выделенную из биомассы тотальную ДНК очистили от РНК путем обработки РНКазой А, после чего обработали ультразвуком в течение 5 минут, с целью создания PCO для рвПЦР. Электрофоретическое разделение в 1,5% агарозном геле в присутствии бромистого этидия показало, что диапазон фрагментов ДНК, обработанной ультразвуком (ДНКуз), находится в пределах от 80 до 500 п.о.

На начальных этапах разработки методики часто используют универсальные коммерческие наборы. Затем подбирают компоненты системы и условия метода для каждого исследуемого объекта. Была проведена оценка содержания остаточной ДНК *E.coli* в АФС инсулина и гистона H1.3 при использовании стандартов и праймеров коммерческого набора на основе SYBR GREEN I (рис.1), DNA Extraction and Amplification Kit for the Measurement of Residual *E.coli* Host Cell DNA (#D415T, Cygnus Technologies).



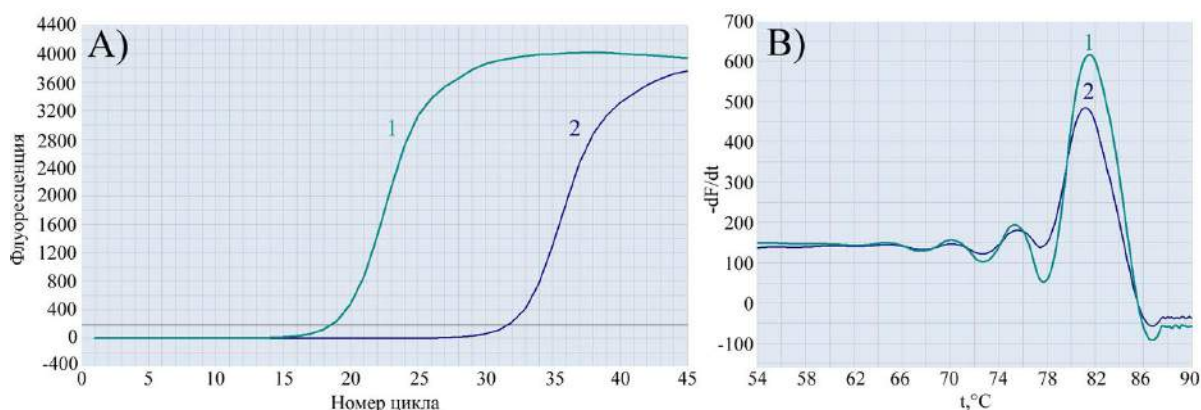


Рисунок 2. А) Графики накопления: ДНКуз инсулина – 70 пг/в реакции (1); ДНКуз гистона Н1.3 - 50 фг в реакции (2). рвПЦР (SYBR GREEN I), программа 2, праймеры к ампликону 100 п.о., 50 фг ДНКт и ДНКуз в реакции. В) Кривые плавления продуктов амплификации. Тпл 100 п.о. около 81,5°С.

Было проведено сравнение результатов рвПЦР (SYBR GREEN I) при использовании разработанных праймеров к 16S РНК *E.coli* и праймеров из набора Cugnus. Представлены данные на примере субстанции гистона Н1.3, размер ампликона для праймеров к 16S РНК *E.coli* 425 п.о. В

качестве положительного контроля в реакцию вводили ДНКуз штамма-производителя гистона Н1.3. При этом были полностью соблюдены рекомендации набора Cugnus в отношении количества праймеров и температурного режима реакции.

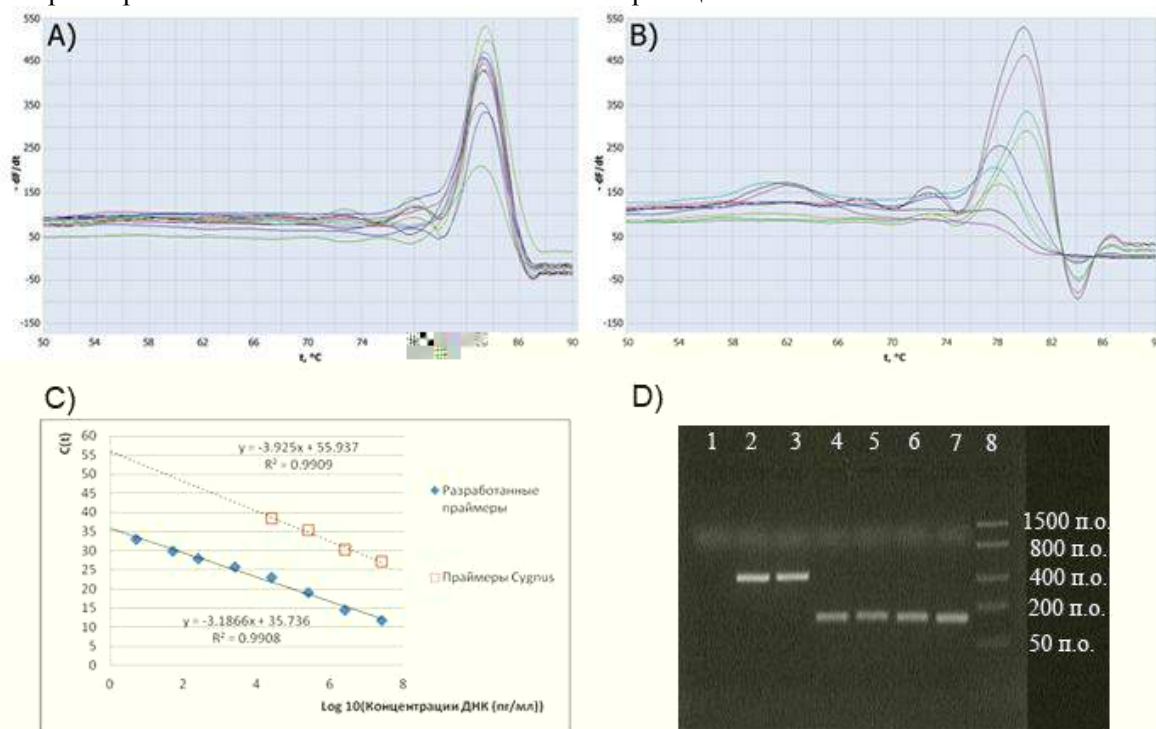


Рисунок 3. А), В) – Кривые плавления для продуктов амплификации праймеров к 16S и праймеров Cugnus соответственно рвПЦР (SYBR GREEN I); С) Калибровочные кривые для результатов амплификации разработанных праймеров к 16S и праймеров Cugnus соответственно. Количество ДНКт: 25 нг; 2,5 нг; 250 пг; 25 пг; 250 фг; 50 фг; 25 фг; 5 фг; 0 фг. Д) Электрофореграмма в 2,5% агарозном геле продуктов рвПЦР: 1 – вода; 2,3 - ДНКт гистона Н1.3 2,5 пг/в реакции + праймеры к ампликону 425 п.о.; 4,5,6,7 – ДНКт гистона Н1.3 2,5 пг/в реакции + праймеры Cugnus.

В результате рвПЦР была рассчитана эффективность реакции для обеих пар

праймеров, эта величина составила 2,06 в случае 16S праймеров и 1,79 в случае праймеров *Cygnus*. Димеров праймеров для реакции с 16S праймерами не было выявлено (рис. 3А), в отличие от кривых плавления для праймеров из набора *Cygnus* (рис. 3В), где виден пик в области 60-65 °С, соответствующий димерам праймеров. Это говорит о неоптимальности условий реакции, об этом также свидетельствует разброс температур плавления продуктов ПЦР (рис. 3В). Предел чувствительности метода с праймерами *Cygnus* и ДНКуз штамма-продуцента гистона Н1.3 в качестве положительного контроля составил 25 пг в реакции. Разработанные праймеры для штамма продуцента гистона Н1.3 более чем в 30 раз чувствительнее праймеров коммерческого набора. В случае Электрофорез в 2,5 % агарозном геле в присутствии SYBR GREEN I позволил оценить размер ампликонов для продуктов реакции (рис. 3С,Д). Для инсулина разработанные праймеры к геномной ДНК штамма-продуцента также показали наибольшую чувствительность (30 раз), по сравнению с праймерами из коммерческого набора.

Таким образом, рассматриваемый коммерческий набор не подходит для определения минимальных количеств ДНК в субстанции. Его целесообразно применять лишь на начальных этапах разработки методики ПЦР.

Поскольку интеркалирующий краситель SYBR Green I связывается с любыми двухцепочечными ДНК, в том числе и димерами праймеров, с целью преодоления недостатков оптимизируемой реакции и для повышения чувствительности системы *rt*ПЦР было предложено использование метода со специфической системой детекции (TaqMan). Основными преимуществами метода TaqMan, относительно SYBR GREEN является возможность проведения нескольких реакций в одной смеси (например одновременное определение содержания плазмидной и геномной ДНК штамма-продуцента в АФС), меньший риск

контаминации, большая точность при малых количествах субстрата. Были разработаны линейно-разрушаемые пробы, которые вводили в реакцию с исследуемыми праймерами к геномной ДНК штамма-продуцента: **TaqMan зонды:**
16S-RealTime(1) 5' R6G- CTA ATA CCG CAT AAC GTC GCA AGA – BHQ2 - 3'; **16S-RealTime(2)** 5' FAM- CTA ATA CCG CAT AAC GTC GCA AGA – RTQ1 - 3'; **16S-RealTime(3)** 5' FAM- CTA ATA CCG CAT AAC GTC GCA AGA – BHQ1 - 3'; **16S-RealTime(4)** 5' FAM- CTA ATA CCG CAT(BHQ1) AAC GTC GCA AGA - 3'; **16S-RealTime(5)** 5' FAM - ATA CCG CAT AAC GTC GCA AGA CCA AAG- BHQ1 - 3'.

Наибольшую чувствительность система имела при использовании зондов с флуоресцентными красителями **16S-RealTime(1)**, **16S-RealTime(2)** и **16S-RealTime(5)**. Проводилась оптимизация *rv*ПЦР по следующим параметрам: концентрация праймеров и зондов в реакции, время и температура отжига. При этом не удалось достичь той чувствительности, которая наблюдается в реакциях с SYBR GREEN I, но при этом эффективности реакции TaqMan была около 2. Несмотря на преимущества TaqMan, при помощи SYBR можно оценить температуру плавления продукта реакции. Это важно, поскольку разница температуры плавления ампликона положительного контроля и ампликона исследуемой субстанции может говорить о синтезе другого продукта, отличного от ампликона в контроле. Что было выявлено при анализе остаточной ДНК штамма-продуцента Гистона в АФС. В пробирку вносили ДНК, экстрагированную из 10 мкг АФС гистона Н1.3, к субстанции добавляли 50 фг РСО - ДНКуз гистона Н1.3. В качестве положительного контроля также использовали ДНКуз в количестве 50 фг в реакции. Метод добавок [6] показал, что количество остаточной ДНК штамма-продуцента в субстанции составило 6565 фг в 10 мкг белка, что превышает предельно допустимое значение (рис. 4).

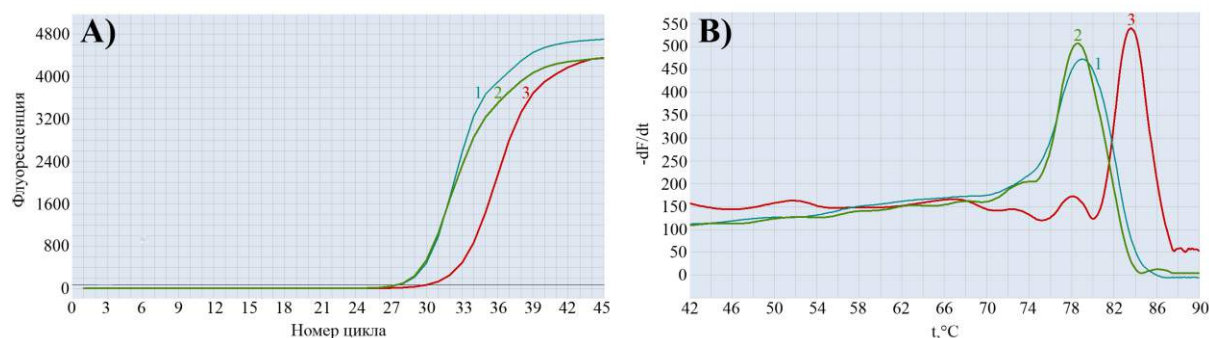


Рисунок 4. А) Метод добавок. Графики накопления ДНКуз для ампликона 425 п.о. 1 - ДНК, выделенная из трипсинолизированного гистона (количество белка 10 мкг в реакции) + ДНКуз 50 фг в реакции; 2 - ДНК, выделенная из трипсинолизированного гистона (количество белка 10 мкг в реакции); 3 - ДНКуз 50 фг в реакции. В) Кривые плавления продуктов амплификации.

При этом температура плавления продуктов рвПЦР для ДНКуз 83,1°C соответствовала ампликону 425 п.о., этот показатель в случае АФС и АФС+ДНКуз составлял около 79,0 °С. Для оценки размеров продуктов реакции провели горизонтальный электрофорез в агарозном геле в присутствии SYBR GREEN I (рис. 5). В случае РСО полоса на

электрофореграмме соответствовала ампликону размером 425 п.о. Если же в пробирках присутствовала остаточная ДНК, выделенная из трипсинолизированной субстанции гистона Н1.3, имела место амплификация продукта похожего размера, но отличающегося от ампликона 425 п.о. [7].

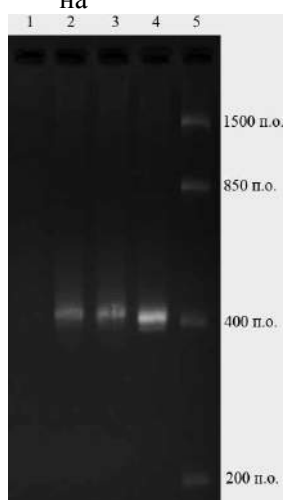


Рисунок 5. Электрофореграмма в 5% агарозном геле результатов амплификации фрагмента 425 п.о. в присутствии SYBR GREEN I. Программа 2. Метод добавок, концентрации в реакции: 1 - вода; 2 - ДНК, выделенная набором Cygnus из 10 мкг трипсинолизированной АФС гистона Н1.3; 3 - ДНК, выделенная набором Cygnus из 10 мкг трипсинолизированной АФС гистона Н1.3 + ДНК гистона Н1.3 50 фг; 4- ДНК гистона Н1.3 50 фг; 5 - Маркер молекулярных весов.

Провели секвенирование двух продуктов рассматриваемой реакции. Для этого амплифицировали продукт из субстанции гистона Н1.3, а также провели амплификацию положительного контроля ДНКуз. После чего из реакционной смеси была выделена ДНК и доведена до необходимой для секвенирования

концентрации. Результаты оценивали при помощи программы Sequencing Analysis 5.2.0. Данные показали, что праймеры выявляют помимо продукта, соответствующего положительному контролю, еще один продукт амплификации в исследованных АФС.

Заключение

Рассматриваемый в данном исследовании метод позволяет определить предельно допустимое количество остаточной ДНК в АФС гистона Н1.3 с высокой степенью достоверности. Внутрисерийное и межсерийное стандартное отклонение для шести повторов не превышает 0,99%. Разработанные праймеры к геномной ДНК штамма-производителя инсулина показали наибольшую чувствительность (29 раз), по сравнению с праймерами из коммерческого набора по выявлению остаточной ДНК *E.coli* (Cygnus Technologies). В случае гистона Н1.3 исследуемые праймеры оказались в 30 раз чувствительнее праймеров коммерческого набора. Сделан выбор в пользу рвПЦР на основе SYBR GREEN I, в сравнении с технологией TaqMan. Выбор также был основан на экономических соображениях и затратах времени на организацию эксперимента. Если TaqMan зонд и праймеры не подходят, то продолжать оптимизацию реакции можно лишь после разработки и синтеза нового зонда. На основе результатов данных исследований была разработана производственная документация, стандартные операционные процедуры для методик ПЦР, рвПЦР. Вышеуказанные методики используют для рутинного анализа в контроле качества при производстве активной фармацевтической субстанции инсулина и гистона Н1.3, а также при оценке рисков и при проведении валидационных испытаниях на Опытном биотехнологическом производстве ИБХ РАН.

Список литературы

1. European Pharmacopoeia 8.0, European Department for the Quality of Medicines, 2014.
2. FDA Briefing Document/Vaccines and Related Biological Products Advisory Committee Meeting, Cell Lines Derived from Human Tumors for Vaccine Manufacture, March, 2014
3. ICH harmonised tripartite guideline / Quality of Biotechnological Products: Derivation and Characterisation of Cell Substrates, Used for Production of Biotechnological/Biological products Q5D, March, 1998.
4. WHO Expert Committee on Biological Standardization / Guidelines on evaluation of similar biotherapeutic products (SBP), October, 2009.
5. М.Ю. Скоблов, Е. Д. Шибанова, Е.В. Ковалева, Д.И. Баирамашвили, Ю.С. Скоблов, А.И. Мирошников /Количественное определение содержания ДНК в генно-инженерных активных фармацевтических субстанциях методом ПЦР в реальном времени/ Биоорганическая химия. 2010. Т.36.№1. С.119-123
6. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. / Molecular Cloning: A Laboratory Manual. - N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1982. pp 545.
7. Е. В. Ковалева, А. П. Баранник, Ю.С. Скоблов, Е. Д. Шибанова, В.И. Швец /Разработка и применение метода рвПЦР для анализа остаточной ДНК штамма-производителя в субстанции гистона Н1.3./ Биотехнология 2015, №2, С. 65-72.

ХИМИЧЕСКИЕ НАУКИ

ОКИСЛЕНИЕ О-ДИАНИЗИДИНА ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ ОКСИДОРЕДУКТАЗАМИ

Тихонов Б.Б.* Стадольникова П.Ю.**, Сидоров А.И.***

*

**

«

», .

2-8 Sepabeads EC-NA403,

2-8 –

ABSTRACT

Creation and research of physical and chemical properties and kinetic parameters of effective catalysts of o-dianisidine oxidation on the basis of the Horseradish peroxidase immobilized on various firm carriers was a research objective. As a result of work multilayered heterogeneous catalysts on the basis of the Horseradish peroxidase immobilized on the ion-exchangers KU 2-8 and Sepabeads EC-NA403 were synthesized, the component structure of catalysts is optimized, kinetic parameters of the synthesized catalysts are determined, is revealed that the most effective of the synthesized catalysts is the system " KU 2-8-hitosan-glutaric dialdehyde-peroxidase". Besides, it is revealed that residual activity of the immobilized peroxidase is lower than activity of native enzyme, however catalysts are stable in consecutive experiments, and the immobilization does enzyme more convenient for application in technological processes.

KEYWORDS: o-dianisidine, oxidation, catalysts, oxidoreductases, horseradish peroxidase

ВВЕДЕНИЕ

Ароматические амины относятся к химическим соединениям, получаемым из ароматических углеводородов (бензола, толуола, нафталина, антрацена, дифенила и т.д) заменой, по крайней мере, одного атома водорода аминогруппой $-NH_2$. Этот класс веществ относится к токсичным соединениям, широко используемым в различных отраслях промышленности. С точки зрения профессиональной вредности одним из наиболее важных ароматических аминов является о-дианизидин (другие названия – прочный синий В, 3,3'-диметоксибензидин). Это соединение применяется в промышленности для получения большого числа diaзокрасителей

для шерсти, шелка, хлопчатобумажных тканей и других материалов [3, 4]. о-дианизидин относится к сильнейшим канцерогенам, вызывающим рак мочевого пузыря и почек, а также раздражающе действует на кожу и слизистые оболочки [1]. Все эти факты делают проблему его утилизации (в том числе, удаления его из промышленных стоков) достаточно острой и актуальной. Задача удаления органических загрязнителей из промышленных стоков в настоящее время полностью не решена [14]. Перспективным направлением исследований утилизации органических контаминантов водных ресурсов является использование гетерогенных катализаторов на основе

иммобилизованных ферментов, прежде всего – оксидоредуктаз, способных переводить производные фенола и бензола в менее опасные полимерные продукты, выпадающие в осадок, что делает возможным их удаление из реакционной среды простым фильтрованием [7, 8, 11]. Оксидоредуктазы (К.Ф. 1; в том числе - пероксидаза, тирозиназа, лакказы, каталаза и т.д.) – наиболее распространенные и стабильные ферменты с высокой субстратной специфичностью, доказавшие свою эффективность в реакциях окисления широкого спектра субстратов органической и неорганической природы [12].

Ферменты используются в промышленности как в свободном, так и в связанном (иммобилизованном) состоянии. Их использование в промышленных процессах очень выгодно как с экономической, так и с экологической точек зрения, поскольку ферментативные реакции проходят в мягких условиях без образования побочных продуктов. При этом иммобилизация во многих случаях является единственным способом повышения эффективности биокаталитических процессов. Активность иммобилизованного фермента обычно несколько ниже его активности в растворе, однако этот недостаток компенсируется возможностью многократного использования фермента. В то же время, не существует метода иммобилизации, который был бы универсален для всех ферментов и очень часто иммобилизация вносит дополнительные проблемы и в сам процесс, и в оценку его кинетических параметров. Для создания эффективных биокатализаторов целесообразно проводить

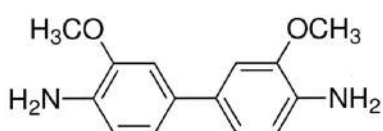
их так называемый «рациональный дизайн» с учетом различных факторов: планируемой области применения, желаемых свойств поверхности носителя, стабильности к различным воздействиям [13]. В нескольких работах исследователями была доказана возможность ковалентной иммобилизации оксидоредуктаз на носителях различной природы [6, 10]. Коллективом авторов статьи также ранее уже были получены данные об эффективности катализаторов на основе иммобилизованных оксидоредуктаз в окислении фенола и его производных [5].

Целью данного исследования было создание и исследование физико-химических свойств и кинетических параметров эффективных катализаторов окисления о-дианизида на основе пероксидазы хрена, иммобилизованной на различных твердых носителях.

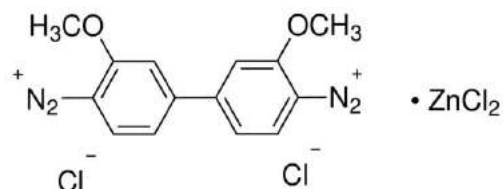
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы

В работе использовали следующие компоненты (в скобках – условное обозначение): источником ферментативной активности был препарат пероксидазы хрена (Fluka, 900 ед/мг); в качестве носителей использовались ионообменная смола КУ 2-8 и коммерческий носитель иммобилизации ферментов Sepabeads EC-NA403 (Resindion, Италия); модификатором являлся хитозан кислоторастворимый средней вязкости (Fluka); активирующий агент - глутаровый диальдегид (DC Panreac); субстраты для окисления – о-дианизидин (Д1, прочный синий В) (рисунок 1а) и о-дианизидин соль (Д2, прочный синий В соль) (рисунок 1б).



а

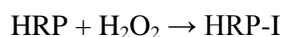


б

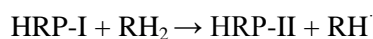
Рисунок 1 - Субстраты для окисления: а – о-дианизидин; б - о-дианизидин дигидрохлорид

Пероксидаза хрена (HRP, молекулярный вес ~ 40 кДа, К.Ф. 1.11.1.7) представляет собой гликопротеид, состоящий из полипептидной цепи, формирующей двухдоменную глобулу, и

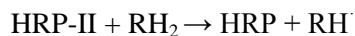
гемовой простетической группы с атомом железа, располагающейся между доменами [9]. Механизм каталитического действия пероксидазы хрена хорошо изучен:



1)



2)



3)

В реакции (1) происходит окисление нативного фермента (HRP) перекисью водорода двумя электронами с получением соединения I (HRP-I), активной формы фермента, в котором Fe^{3+} окисляется до феррилла ($\text{Fe}^{\text{IV}} = \text{O}$), а порфирин – до порфиринового радикала. В реакции (2) HRP-I принимает субстрат (RH_2) в свой активный центр и выполняет его окисление. При восстановлении HRP-I образуется соединение II (HRP-II), содержащее оксоферрилимидазол. В реакции (3) HRP-II окисляет вторую молекулу субстрата и восстанавливается до HRP, содержащего Fe^{3+} . Продуктами реакции окисления являются свободные радикалы RH^\cdot , которые могут самопроизвольно взаимодействовать между собой с образованием олигомеров или полимеров, выпадающих в осадок. При этом взаимодействие HRP-I с донором происходит гораздо медленнее, чем образование HRP-I, и соответственно, является лимитирующей стадией процесса [9].

Оборудование и приборы

Изучение кинетики окисления о-дианизидина в присутствии нативной и иммобилизованной пероксидазы хрена осуществлялось в термостатируемом реакторе периодического действия с возвратно-поступательным качанием. Оптическая плотность реакционной смеси измерялась на Спектрофотометре СФ-2000.

Синтез иммобилизованных биокатализаторов

Были синтезированы многослойные гетерогенные катализаторы, активный компонент которых - пероксидаза хрена - был присоединен к поверхности носителя (КУ 2-8 или Sepabeads EC-NA403). Иммобилизация пероксидазы хрена на КУ 2-8 проводилась по известной методике [5]. Иммобилизация пероксидазы хрена на Sepabeads EC-NA403 проводилась в соответствии с сопроводительной документацией к данному носителю.

Иммобилизация проводилась в соответствии с выбранными схемами

синтеза с промежуточной отмывкой дистиллированной водой от неспецифически связанных компонентов.

Методика проведения кинетических экспериментов

Для проведения кинетических экспериментов в каталитическом реакторе смешивались раствор исходного фермента (или катализатор, приготовленный из того же количества экстракта), раствор о-дианизидина (или о-дианизидина соли) необходимой концентрации, фосфатный буферный раствор ($\text{pH} = 7,0$) и раствор перекиси водорода (10 %-ный избыток относительно о-дианизидина) в соотношении 1:1:1:1 (об.). Первичные кинетические данные представляли собой зависимость от времени оптической плотности раствора при $\lambda = 460$ нм, увеличивающейся в процессе окисления вследствие образования окрашенных продуктов. Начальная скорость реакции и другие кинетические параметры определялась методом двойных обратных координат после пересчета оптической плотности в концентрацию субстрата [2].

Результаты и обсуждение

Определение оптимальных условий проведения процесса окисления

По результатам варьирования условий реакций окисления о-дианизидина и о-дианизидина соли при $C_0 = 20$ ммоль/л были выявлены оптимальные условия: температура - 25°C , интенсивность перемешивания – 300 мин^{-1} , и $\text{pH} = 7,0$, которые и использовались при изучении кинетики.

Сравнение эффективности биокатализаторов различного состава

В результате иммобилизации были получены гетерогенные катализаторы «КУ 2-8 – хитозан – глутаровый диальдегид – пероксидаза» (К1) и «Sepabeads EC-NA403 – хитозан – глутаровый диальдегид – пероксидаза» (К2), схемы которых представлены на рисунке 2.

пероксидазы хрена, иммобилизованных на ионообменную смолу КУ 2-8 и Sepabeads ЕС-НА403, оптимизирован компонентный состав катализаторов;

- определены кинетические параметры синтезированных катализаторов, выявлено, что наиболее эффективным из синтезированных биокатализаторов является система «катионит КУ 2-8 – хитозан – глутаровый альдегид – пероксидаза»;

- остаточная активность иммобилизованной пероксидазы ниже активности нативного фермента, однако катализаторы стабильны в последовательных экспериментах, а иммобилизация делает фермент более удобным для применения в технологических процессах.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований.

Список литературы

1. Быховская М.С., Гинзбург С.Л., Хализова О.Д. Методы определения вредных веществ в воздухе (Практическое руководство). М.: Медицина, 1966. 595 с.

2. Варфоломеев С.Д. Химическая энзимология [Текст]. М.: Academia, 2005. 472 с.

3. Венкатарман К. Химия синтетических красителей: В 2-х т.: т.1. Пер. с англ. Л.: ГНТИ Хим. лит., 1956. 804 с.

4. Гурвич Я.А., Кумок М. Химия и технология промежуточных продуктов и органических красителей. М.: Высшая школа, 1968. 360 с.

5. Сидоров А.И., Лакина Н.В., Сульман Э.М., Ожимкова Е.В., Манаенков О.В., Тихонов Б.Б. Очистка сточных вод от фенолов с использованием иммобилизованных оксидоредуктаз растений и грибов // Вестник Тверского государственного

университета. Серия «Биология и экология». Тверь: ТвГУ, Вып. 21(№2). 2011. С. 74-81.

6. Bindhu L.V., Abraham Bindhu T. E. Immobilization of horseradish peroxidase on chitosan for use in nonaqueous media // J. Appl. Polym. Sci. 2003. Vol. 88. P. 1456-1464.

7. Caza N., Bewtra J.K., Biswas N., Taylor K.E. Removal of phenolic compounds from synthetic wastewater using soybean peroxidase // Wat. Res. 1999. Vol. 33. P. 3012–3018.

8. Cooper V.A., Nicell J.A. Removal of phenols from a foundry wastewater using horseradish peroxidase // Wat. Res. 1996. Vol. 30 (4). P. 954-964.

9. Dunford H.B., Stillman J.S. On the function and mechanism of action of peroxidase // Coord. Chem. Rev. 1976. V.19. N 3. P.187-251.

10. Ensuncho L., Alvarez-Cuenca M., Legge R.L. Removal of aqueous phenol using immobilized enzymes in a bench scale and pilot scale three-phase fluidized bed reactor // Bioprocess. Biosyst. Eng. 2005. Vol. 27. P. 185-191.

11. Karam J., Nicell J.A. Potential applications of enzymes in waste treatment // J. Chem. Tech. Biotechnol. 1997. Vol. 69. P. 141–153.

12. Schmid A., Hauer B., Kiender A., Wubbolts M., Witholt B. Industrial biocatalysis today and tomorrow // Nature. 2001. Vol. 409. P. 258-268.

13. Tischer W., Wedekind F. Immobilized enzymes: methods and applications // Top. Curr. Chem. 1999. Vol. 200. P. 95-126.

14. Wilberg K.Q., Nunes D.G., Rubio J. Removal of phenol by enzymatic oxidation and flotation // Braz. J. of Chem. Eng. 2000. Vol. 17. P. 4-7